

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 918**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2008 PCT/US2008/011492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009 WO09048538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08838455 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2205632**

54 Título: **Uso de anticuerpo anti-amiloide beta en enfermedades oculares**

30 Prioridad:

05.10.2007 US 960617 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.04.2017

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US y
AC IMMUNE S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PFEIFER, ANDREA;
MUHS, ANDREAS;
WATTS, RYAN y
PIHLGREN, MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 609 918 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de anticuerpo anti-amiloide beta en enfermedades oculares

Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de Serie 60/960.617, presentada el 5 de octubre de 2007, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el diagnóstico y el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de trastornos y anomalías asociadas con la proteína amiloide tal como la enfermedad de Alzheimer.

10 La amiloidosis no es una sola enfermedad, más bien se trata de un grupo diverso de procesos patológicos progresivos caracterizado por depósitos de tejido extracelular de una proteína cerosa parecida al almidón, denominada amiloide, que se acumula en uno o más órganos o sistemas del cuerpo. A medida que los depósitos de amiloide se acumulan, empiezan a interferir con la función normal del órgano o sistema del cuerpo. Existen al menos 15 tipos diferentes de amiloidosis. Las formas principales son la amiloidosis primaria sin antecedente conocido, la amiloidosis secundaria después de algún otro estado, y la amiloidosis hereditaria.

La amiloidosis secundaria aparece durante una infección crónica o una enfermedad inflamatoria, tal como tuberculosis, una infección bacteriana denominada fiebre mediterránea familiar, infecciones óseas (osteomielitis), artritis reumatoide, inflamación del intestino delgado (ileítis granulomatosa), enfermedad de Hodgkin, y lepra.

20 Los depósitos de amiloide incluyen componente amiloide P (pentagonal) (AP), una glicoproteína relacionada con la amiloide P en suero normal (SAP), y glicosaminoglicanos sulfatados (GAG), hidratos de carbono complejos del tejido conectivo. Las fibrillas de proteína amiloide, que representan aproximadamente el 90 % del material amiloide, comprenden uno de varios tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas pueden plegarse en las denominadas fibrillas de lámina "plegada beta", una configuración proteica única que presenta sitios de unión para el rojo Congo dando como resultado las propiedades únicas de tinción de la proteína amiloide

25 Muchas enfermedades del envejecimiento se basan en o están asociadas con las proteínas de tipo amiloide y se caracterizan, en parte, por la acumulación de depósitos extracelulares de material amiloide o de tipo amiloide que contribuye a la patogénesis, así como la progresión de la enfermedad. Estas enfermedades incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tal como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo Parkinson-Demencia de Guam. Otras enfermedades que se basan en o que están asociadas con proteínas de tipo amiloide son la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Aparición en Adultos, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otros, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido al depósito de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a degeneración retiniana primaria, y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

45 Aunque la patogénesis de estas enfermedades puede ser diversa, sus depósitos característicos contienen a menudo muchos constituyentes moleculares compartidos. En gran medida, esto puede atribuirse a la activación local de las vías pro-inflamatorias lo que conduce, de ese modo, al depósito simultáneo de los componentes del complemento activados, reaccionantes de fase aguda, moduladores inmunes y otros intermediarios inflamatorios (McGeer et al., 1994).

50 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurológico que se cree, principalmente, causado por placas amiloides, una acumulación de depósito anómalo de proteínas en el cerebro. El tipo más frecuente de amiloide encontrado en el cerebro de los individuos afectados se compone principalmente de fibrillas A β . La evidencia científica demuestra que un aumento en la producción y acumulación de proteína beta-amiloide en placas conduce a la muerte de las células nerviosas, lo cual contribuye al desarrollo y a la progresión de la AD. La pérdida de células nerviosas en áreas del cerebro estratégicas, a su vez, causa la reducción de los neurotransmisores y al deterioro de la memoria. Las proteínas principalmente responsables de la acumulación de placa incluyen la proteína precursora amiloide (APP) y dos presenilinas (presenilina I y presenilina II). La escisión secuencial de la proteína precursora amiloide (APP), que se expresa y cataboliza constitutivamente en la mayor parte de las células, mediante las enzimas β -secretasa y γ -secretasa conduce a la liberación de un péptido A β de 39 a 43 aminoácidos. La degradación de las APP aumenta probablemente su propensión a agregarse en placas. Es especialmente el

fragmento A β (1-42) que tiene una alta propensión de acumular agregados debido a dos restos aminoácidos muy hidrófobos en su C terminal. Por lo tanto, se cree que el fragmento A β (1-42) está principalmente involucrado y es responsable del inicio de la formación de placas neuríticas en la AD teniendo, por lo tanto, un alto potencial patológico. Existe, por tanto, la necesidad de agentes que impidan la formación de de placas amiloides y que difundan las placas existentes en la AD.

Los síntomas de la AD se manifiestan lentamente y el primer síntoma puede ser sólo un fallo leve de la memoria. En esta etapa, los individuos pueden olvidar acontecimientos recientes, actividades, los nombres de personas o cosas familiares y pueden no ser capaces de resolver problemas matemáticos sencillos. A medida que avanza la enfermedad, los síntomas son percibidos más fácilmente y llegan a ser bastante serios para hacer que las personas con AD o los miembros de su familia soliciten ayuda médica. Los síntomas de la etapa media de la AD incluyen el olvido de cómo realizar tareas sencillas como el aseo, y presentan problemas para hablar, comprender, leer o escribir. Los pacientes con AD en la fase más avanzada pueden volverse ansiosos o agresivos, pueden quedarse deambulando lejos del hogar y por último necesitar un cuidado total.

En la actualidad, la única manera definitiva de diagnosticar la AD es la identificación de placas y ovillos en el tejido cerebral en una autopsia después de la muerte del individuo. Por tanto, los médicos sólo pueden hacer un diagnóstico de "posible" o "probable" AD mientras la persona todavía está viva. Utilizando los procedimientos actuales, los médicos pueden diagnosticar AD correctamente hasta en un 90 por ciento de las veces utilizando varias herramientas para diagnosticar "probable" AD. Los médicos hacen preguntas sobre la salud general de la persona, los problemas médicos pasados, y la historia de cualquiera de las dificultades que la persona tiene al llevar a cabo actividades diarias. Las pruebas conductuales de la memoria, resolución de problemas, atención, conteo y lenguaje proporcionan información sobre la degeneración cognitiva y las pruebas médicas como los análisis de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo y los escáneres cerebrales pueden proporcionar alguna información adicional.

La gestión de la AD consiste en tratamientos con medicamentos y sin medicamentos. Los tratamientos destinados a cambiar el curso subyacente de la enfermedad (que retrasan o invierten la progresión) han sido hasta el momento, en gran medida, infructuosos. Los medicamentos que restauran la deficiencia (defecto), o el mal funcionamiento, de mensajeros químicos de las células nerviosas (neurotransmisores), en particular los inhibidores de la colinesterasa (ChEI) tal como tacrina y rivastigmina, han demostrado mejorar los síntomas. Los ChEI impiden la degradación enzimática de los neurotransmisores aumentando de ese modo la cantidad de mensajeros químicos disponibles para transmitir las señales nerviosas en el cerebro.

Para algunas personas en las etapas inicial e intermedia de la enfermedad, los medicamentos tacrina (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT[®], Tokio, JP), rivastigmina (EXELON[®], East Hanover, NJ), o (galantamina REMINYL[®], New Brunswick, NJ) pueden ayudar a prevenir el que algunos de los síntomas empeoren durante un tiempo limitado. Otro medicamento, la memantina (NAMENDA[®], Nueva York, NY), ha sido aprobado para el tratamiento de la AD de moderada a severa. Los medicamentos están disponibles también para hacer frente a las manifestaciones psiquiátricas de la AD. Además, algunos medicamentos pueden ayudar a controlar los síntomas del comportamiento de la AD como insomnio, agitación, deambulación, ansiedad y depresión. El tratamiento de estos síntomas hace que los pacientes se encuentren a menudo más cómodos y hace su cuidado más fácil para los cuidadores. Por desgracia, pese a los significativos avances en el tratamiento que muestran que esta clase de agentes es sistemáticamente mejor que un placebo, la enfermedad continúa su progresión, y el efecto medio sobre el funcionamiento mental ha sido sólo modesto. Muchos de los fármacos utilizados en los medicamentos de la AD como, por ejemplo, los ChEI tienen también efectos secundarios que incluyen disfunción gastrointestinal, toxicidad hepática y pérdida de peso.

Las deficiencias visuales corticales están, a menudo, asociadas con la AD, a pesar del resultado negativo de la agudeza visual o enfermedad ocular alteradas. Las pruebas post-mortem de pacientes con AD ha mostrado cambios patológicos en las estructuras visuales pre-corticales y una reducción en las fibras del nervio óptico.

La disfunción del procesamiento visual en la AD está también asociado con los cambios neurológicos y la patología dentro del camino ventral, que se extiende desde la retina con las células ganglionares P a través de las capas parvocelulares del núcleo geniculado lateral (LGN) que llega a la corteza inferotemporal (TI), y el camino dorsal, que se extiende desde la retina con las células ganglionares M a través de las capas magnocelulares del LGN, alcanzando el córtex temporal medio. Las placas seniles de los pacientes con AD crean anomalías y disfunciones dentro de estas regiones corticales. Las placas seniles causan también una pérdida en las tareas de percepción visual, tal como una disfunción en el reconocimiento facial de la gente conocida, un estado conocido como prosopagnosia.

Otras enfermedades que se basan en o están asociadas con la acumulación y depósito de proteína de tipo amiloide son el deterioro cognitivo leve, demencia por cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down (trisomía 21), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), y las enfermedades oculares asociadas con las anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo,

tales como el córtex visual que conduce a las deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a la amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y a la degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

El deterioro cognitivo leve (MCI) es un término general que se define más comúnmente como un pequeño pero medible trastorno de la memoria. Una persona con MCI experimenta problemas de memoria mayores de los normalmente esperados por el envejecimiento, pero no muestra otros síntomas de demencia, tal como juicio o razonamiento deteriorados. El MCI es un estado que refleja con frecuencia una etapa preclínica de AD.

La deposición de β -amiloide en el córtex entorrinal (EC) se cree que juega un papel clave en el desarrollo del deterioro cognitivo leve (MCI) en los ancianos. Esto está en consonancia con la observación de que los niveles de $A\beta(1-42)$ en CSF-A disminuyen significativamente una vez que la AD llega a ser clínicamente evidente. En contra de $A\beta(1-42)$ en CSF-A, los niveles de tau en el CSF se incrementan significativamente en la etapa MCI, y estos valores continúan elevándose a partir de entonces, lo que indica que el aumento de los niveles de tau en el CSF puede ayudar en la detección de sujetos con MCI que se prevé que desarrollen AD.

La demencia con cuerpos de Lewy (LBD) es un trastorno neurodegenerativo que puede aparecer en personas mayores de 65 años de edad, que por lo general causa síntomas de deterioro cognitivo (pensamiento) y cambios anómalos en la conducta. Los síntomas pueden incluir deterioro cognitivo, signos neurológicos, trastornos del sueño y falta de autonomía. El deterioro cognitivo es la característica de la LBD que se presenta en la mayoría de los casos. Los pacientes tienen episodios recurrentes de confusión que empeoran progresivamente. La oscilación de la capacidad cognitiva se asocia a menudo con el cambio de grados de atención y de alerta. El deterioro cognitivo y las oscilaciones del pensamiento pueden variar en cuestión de minutos, horas o días.

Los cuerpos de Lewy se forman a partir de proteínas de neurofilamentos fosforilados y no fosforilados; contienen la proteína sináptica alfa-sinucleína así como la ubiquitina, que está involucrada en la eliminación de las proteínas dañadas o anómalas. Además de los Cuerpos de Lewy pueden estar presentes, también, las neuritas de Lewy, que son cuerpos de inclusión en los procesos celulares de las células nerviosas. En el cerebro de los pacientes aquejados de LBD se pueden formar placas amiloides, sin embargo, tienden a ser menores en número que las que se observan en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares, el otro sello distintivo micropatológico de la AD, no son una característica principal de la LBD pero están presentes con frecuencia además de las placas amiloides.

El síndrome de Down (DS) o trisomía 21 es un trastorno genético causado por la presencia de la totalidad o parte de un cromosoma 21 adicional y está asociado a menudo con algún deterioro de la capacidad cognitiva y del crecimiento físico. El DS se caracteriza por el envejecimiento prematuro: la mayoría de los individuos afectados por la enfermedad desarrollan la enfermedad de Alzheimer en su quinta decenio, incluidos los depósitos de la proteína beta-amiloide formadora de placas que son, a menudo, más graves que en la mayoría de los otros pacientes con Alzheimer. Además, muchas personas con DS desarrollan cataratas que empiezan en la infancia y muchos padecen de glaucoma congénito. En los humanos, el gen de la proteína precursora de amiloide, que se escinde para formar beta-amiloide, se localiza en el cromosoma 21. En los individuos afectados por DS se acumula beta-amiloide tanto soluble como intracelular antes que beta-amiloide extracelular, que es la responsable de la formación de placas seniles. Los aumentos en los niveles de beta-amiloide en el Síndrome de Down pueden reflejar el aumento de la expresión y de los niveles de proteína de la enzima 2 de escisión de la proteína precursora de beta-amiloide en el cromosoma 21.

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracteriza por la degeneración de las neuronas motoras superiores e inferiores. En algunos pacientes con ALS, puede estar presente demencia o afasia (ALS-D). La demencia es lo más comúnmente una demencia frontotemporal (FTD), y muchos de estos casos tienen inclusiones ubiquitina-positivas y tau-negativas en neuronas del giro dentado y capas superficiales de los lóbulos frontal y temporales.

La miositis por cuerpos de inclusión (IBM) es una enfermedad discapacitante que normalmente se encuentran en personas mayores de 50 años de edad, en las que las fibras musculares desarrollan inflamación y comienzan a atrofiarse pero en las que el cerebro está a salvo y los pacientes retienen todo su intelecto. Se encontró que dos enzimas involucradas en la producción de la proteína β -amiloide aumentaban en el interior de las células musculares de los pacientes con esta enfermedad muscular progresiva más común de las personas mayores, en las que también hay un aumento de la β -amiloide.

Otra enfermedad que se basa en o está asociada con la acumulación y depósito de la proteína de tipo amiloide es la degeneración macular.

La degeneración macular es una enfermedad ocular común que provoca el deterioro de la mácula, que es la zona central de la retina (el tejido fino como el papel en la parte posterior del ojo donde las células fotosensibles envían señales visuales al cerebro). La visión nítida, clara, "en línea recta" es procesada por la mácula. El daño en la mácula da como resultado el desarrollo de puntos ciegos y visión borrosa o distorsionada. La degeneración macular

asociada a la edad (AMD) es una de las principales causas del deterioro visual en los Estados Unidos y para las personas mayores de 65 años es la principal causa de ceguera legal entre caucásicos. Aproximadamente 1,8 millones de estadounidenses de 40 años y mayores tienen AMD avanzada, y otros 7,3 millones de personas con AMD intermedia están en riesgo sustancial de pérdida de visión. El gobierno estima que en 2020 habrá 2,9 millones de personas con AMD avanzada. A menudo, las víctimas de AMD quedan sorprendidas y frustradas cuando averiguan lo poco que se sabe acerca de las causas y tratamiento de este estado de ceguera.

Existen dos formas de degeneración macular: la degeneración macular seca y la degeneración macular húmeda. La forma seca, en la que las células de la mácula comienzan poco a poco a romperse, se diagnostica en el 85 por ciento de los casos de degeneración macular. Ambos ojos están normalmente afectados por la AMD seca, aunque un ojo puede perder la visión, mientras que el otro ojo permanece no afectado. Las drusas, que son depósitos amarillos bajo la retina, son los primeros signos comunes de la AMD seca. El riesgo de desarrollar AMD seca o AMD húmeda avanzadas aumenta a medida que aumenta el número o tamaño de las drusas. Es posible que la AMD seca avance y cause la pérdida de la visión sin transformarse en la forma húmeda de la enfermedad; sin embargo, también es posible en la fase inicial de la AMD seca cambiar de repente a la forma húmeda.

La forma húmeda, aunque sólo representa el 15 por ciento de los casos, da como resultado un 90 por ciento de la ceguera, y es considerada AMD avanzada (no hay fase inicial o intermedia de la AMD húmeda). La AMD húmeda está siempre precedida por la forma seca de la enfermedad. A medida que la forma seca empeora, algunas personas empiezan a tener vasos sanguíneos anómalos que crecen detrás de la mácula. Estos vasos son muy delicados y tendrán fugas de fluido y sangre (de ahí viene lo de degeneración macular "húmeda"), causando un daño inmediato a la mácula.

La forma seca de la AMD causará inicialmente, a menudo, una visión ligeramente borrosa. El centro de la visión en particular puede entonces volverse borroso y esta región crece a medida que progresa la enfermedad. No se pueden observar síntomas si sólo se ve afectado uno de los ojos. En la AMD húmeda, las líneas rectas pueden verse onduladas y la pérdida de la visión central puede producirse rápidamente.

El diagnóstico de la degeneración macular implica normalmente un examen con dilatación del ojo, prueba de agudeza visual, y una visión de la parte posterior del ojo utilizando un procedimiento denominado fundoscopia para ayudar a diagnosticar la AMD y, si se sospecha la AMD húmeda, puede realizarse también angiografía con fluoresceína. Si la AMD alcanza las fases avanzadas, no hay ningún tratamiento actual para impedir la pérdida de visión. Sin embargo, una fórmula específica de altas dosis de antioxidantes y de zinc puede retrasar o impedir que la AMD intermedia progrese a la fase avanzada. Macugen[®] (inyección de pegaptanib de sodio), la fotocoagulación con láser y la terapia fotodinámica pueden controlar el crecimiento anómalo de los vasos sanguíneos y el sangrado en la mácula, que es útil para algunas personas que tienen AMD húmeda; sin embargo, la visión que ya se ha perdido no se recuperará mediante estas técnicas. Si la visión ya se ha perdido, existen ayudas para la baja visión que pueden ayudar a mejorar la calidad de vida.

Uno de los signos más tempranos de la degeneración macular asociada a la edad (AMD) es la acumulación de depósitos extracelulares conocidos como drusas entre la lámina basal del epitelio pigmentado de la retina (RPE) y la membrana de Bruch (BM). Estudios recientes, llevados a cabo por Anderson et al., han confirmado que las drusas contienen amiloide beta (Experimental Eye Research, 78 (2004), 243-256).

La investigación en curso continúa con los estudios que exploran los factores ambientales, genéticos y de la dieta, que pueden contribuir a la AMD. Nuevas estrategias de tratamiento están siendo también exploradas, que incluyen trasplantes de células de la retina, fármacos que eviten o ralenticen el progreso de la enfermedad, terapia de radiación, terapia génica, un chip de ordenador implantado en la retina que puede ayudar a estimular la visión y agentes que eviten el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos bajo la mácula.

Un factor importante a considerar cuando se desarrollan nuevos fármacos es la facilidad de uso de pacientes pero. La administración de fármacos por vía oral, particularmente comprimidos, cápsulas y cápsulas blandas, representan el 70 % de todas las formas de dosis consumidas debido a la conveniencia del paciente. Los desarrolladores de fármacos están de acuerdo en que los pacientes prefieren la administración oral en lugar de someterse a inyecciones u otras formas más invasivas de administración de medicamentos. También se prefieren las formulaciones que dan como resultado intervalos de baja dosificación (es decir, una vez al día o de liberación lenta). La facilidad de la administración de antibióticos en formas de dosificación oral da como resultado un aumento de la cooperación del paciente durante el tratamiento.

Lo que se necesita son procedimientos eficaces y composiciones para impedir o hacer frente a las complicaciones asociadas con amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluyen la amiloidosis secundaria y la amiloidosis asociada a la edad que incluye, pero que no se limita a, los trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide, tal como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple; la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia asociada al HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), la Diabetes de Aparición en Adultos;

amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluidas las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a la amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y a la degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular. En particular lo que se necesita son agentes capaces de contrarrestar las manifestaciones fisiológicas de la enfermedad, tal como la formación de placas asociadas con la agregación de fibras del péptido amiloide o de tipo amiloide.

Se informó que los anticuerpos anti-amiloide obtenidos por la inoculación de $A\beta_{1-42}$ mezclado con adyuvante completo o incompleto de Freund disminuían la carga amiloide en ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer humana (Schenk et al., 1999). La inoculación intraperitoneal de $A\beta_{1-16}$ tetrapalmitoilada reconstituida en liposomas para ratones transgénicos NORBA obtenía títulos significativos de anticuerpos anti-amiloide, que se informó que solubilizaban fibras amiloides y placas *in vitro* e *in vivo* (Nicolau et al., 2002).

Un posible mecanismo mediante el que se producía la disolución de las placas amiloides y de las fibras fue sugerido en primer lugar por Bard et al., (2000), quien llegó a la conclusión de que los anticuerpos opsonizaban las placas, que posteriormente eran destruidas por los macrófagos de la microglía. De Mattos et al., (2001) indicaron que un mAb dirigido contra el dominio central de β -amiloide era capaz de unirse y secuestrar completamente amiloide en plasma. Argumentaron que la presencia de estos mAb en circulación desplazaban el equilibrio de $A\beta$ entre cerebro y plasma, favoreciendo el aclarado y el catabolismo periféricos en lugar de deposición en el cerebro.

La terapia prolongada en humanos con anticuerpos de roedor puede dar como resultado una respuesta antiglobulina que es detectable en aproximadamente 8-12 días después de la administración y alcanza un pico a aproximadamente 20-30 días. Si se encuentra una respuesta antiglobulina de este tipo, el tratamiento debe interrumpirse después de no más de aproximadamente 10 días y, generalmente, se excluye repetir el tratamiento en una fecha posterior porque conduce a la rápida aparición de una respuesta secundaria a antiglobulina. Aunque los anticuerpos de roedores comparten un alto grado de conservación de secuencia con la de anticuerpos humanos, hay muchas diferencias en las secuencias entre los anticuerpos de roedores y de humanos suficientes para que los anticuerpos de roedores sean inmunogénicos en humanos.

Este problema puede superarse mediante la generación directa de anticuerpos en el ser humano o por la creación de "humanizados" (también conocidos como anticuerpos "reformados"). Los anticuerpos humanizados tienen una secuencia de aminoácidos en una región variable que contiene las CDR derivadas de roedor intercaladas en secuencias en el marco humano o de tipo humano. Dado que la especificidad del anticuerpo humanizado es proporcionada por las CDR derivadas de roedores, sus restos se van a utilizar esencialmente sin cambios con sólo pequeñas modificaciones que sean admisibles, que no interfieran significativamente con la afinidad y especificidad del anticuerpo por su antígeno diana. Los restos del marco se pueden derivar de cualquier primate o, particularmente, de cualquier región variable humana o puede ser una combinación de los mismos y la región variable diseñada resultante se consideraría reformada.

Para maximizar la probabilidad de que se mantenga afinidad en el anticuerpo reformado es importante hacer una adecuada selección de la región marco. Se sabe que las secuencias marco sirven para mantener las CDR en su orientación espacial correcta para la interacción con el antígeno, y que los restos del marco pueden a veces incluso participar en la unión al antígeno. A fin de mantener la afinidad del anticuerpo por su antígeno es ventajoso seleccionar secuencias marco humanas que son en su mayoría similares a las secuencias de los marcos de los roedores. Entonces, todavía puede ser necesario reemplazar uno o más aminoácidos en la secuencia marco humana con el resto correspondiente en el marco del roedor para evitar pérdidas con la afinidad. Esta sustitución puede ser asistida mediante modelos informáticos.

La publicación internacional n.º WO 2007/068412 divulga un anticuerpo anti-beta-amiloide mACI-01-AB7 C2 de ratón, cuyo anticuerpo es de la subclase IgG2b y es capaz tanto de la disgregación de las placas existentes como de impedir la formación de nuevas placas.

La publicación internacional n.º WO 2006/039327 divulga composiciones que comprenden anticuerpos anti-beta-amiloide y procedimientos para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades oftálmicas caracterizadas por la deposición de amiloide en el ojo o en el nervio óptico en un paciente.

La patente de EE.UU. n.º 6.737.056 B1 divulga polipéptidos que contienen regiones Fc que han alterado la función efectora, como consecuencia de una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos.

Las publicaciones internacionales n.º WO 2008/011348 y WO 2008/060364 divulgan anticuerpos humanizados, incluido el anticuerpo hC2 humanizado, y el uso de tales anticuerpos para el tratamiento y diagnóstico de

amiloidosis.

La publicación internacional n.º WO 2008/156622 divulga anticuerpos humanizados, incluido el anticuerpo hC2 humanizado, con una región Fc de la IgG₁ que contiene una o más modificaciones de aminoácidos.

5 La presente invención proporciona nuevos procedimientos y composiciones que comprenden anticuerpos muy específicos y muy eficaces, particularmente anticuerpos quiméricos que incluyen fragmentos de los mismos, más particularmente anticuerpos parcial o totalmente humanizados que incluyen fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a epitopos específicos de un intervalo de antígenos β -amiloide, que pueden presentarse al anticuerpo en una forma monómera, dímera, trímera, etc., polímera, en forma de un agregado, fibras, filamentos o en la forma condensada de una placa. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis asociada a la edad, que incluye, pero no se limita a, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo Parkinson-Demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o que están asociadas con proteínas de tipo amiloide tales como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, enfermedad de Parkinson, demencia asociada al HIV, ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Aparición en Adultos, amiloidosis cardíaca senil, tumores endocrinos, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos en el ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido al depósito de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular asociada a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

Sumario de la invención

30 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos y, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dicho uno, dichos al menos dos y dichos al menos tres sitios de unión comprenden cada uno al menos uno o dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo.

35 Las realizaciones de la presente invención están representadas por y definidas en las reivindicaciones. Cualquier referencia a la invención o a los aspectos o realizaciones de la invención, mencionada en el presente documento, que exceda el alcance de la invención como se representa por o se define en las reivindicaciones no forman parte de la invención pero representan información de fondo sólo de utilidad para la comprensión de la invención,

40 La presente invención proporciona, en una realización, una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizado por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) la distrofia reticular, pero particularmente para uso en el tratamiento de glaucoma, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto separado en la proteína beta-amiloide, en donde el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos RVSNRFS, o la secuencia de aminoácidos KVSSRFS; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y (b) una región Fc de la IgG con una unión reducida al Fc.gamma.R que tiene una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc de la IgG.

55 En una realización específica, el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende una mutación D265A en la región Fc.

En otra realización específica, la composición farmacéutica de la invención tal como se describe en el presente documento es para uso en el tratamiento del glaucoma seleccionado del grupo que consiste en glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado,

glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario y glaucoma exfoliativo.

En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a una parte funcional del mismo, que reconoce y se une en al menos un sitio distinto en la proteína beta-amiloide y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos RVSNRFS, o la secuencia de aminoácidos KVSSRFS; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y (b) una región Fc de la IgG con una unión reducida a Fc.gamma.R que tiene una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249,252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 437, 438 o 439 de la región Fc de la IgG, para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular,

En otra realización, el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular, según la reivindicación precedente, en donde el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende una mutación D265A en la región Fc.

La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado o a una parte funcional del mismo, para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según cualquiera de las realizaciones precedentes al reducir la carga de placa o la cantidad de placas en la capa de células ganglionares de la retina o al disminuir la cantidad total de β -amiloide soluble en la capa de células ganglionares de la retina.

En una realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado o a una parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizado por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según cualquiera de las realizaciones precedentes mediante la prevención, tratamiento o alivio de los efectos del glaucoma, de la neuritis óptica ocular, de la amiloidosis y/o de la distrofia reticular.

En una realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado o a una parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según cualquiera de las realizaciones precedentes manteniendo o disminuyendo la presión ocular en los ojos de un animal que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular y/o la distrofia reticular.

En una realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado o a una parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según cualquiera de las anteriores realizaciones, el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15.

En una realización específica, el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo para uso según una cualquiera de las realizaciones precedentes en el tratamiento del glaucoma, particularmente el glaucoma seleccionado del grupo que consiste en glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario y glaucoma exfoliativo.

En una realización, la invención se refiere a la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular

caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15.

- 5 En una realización, la invención se refiere al anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo, o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde el sujeto es un mamífero, en particular, un ser humano.

15 La invención se refiere, además, al uso de un anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo como se define en una cualquiera de las realizaciones precedentes, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios asociados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular,

- i) reduciendo la carga de placa en la capa de las células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
- 20 ii) reduciendo la cantidad de placas en la capa de las células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
- iii) disminuyendo la cantidad total de β -amiloide soluble en la capa de las células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
- 25 iv) previniendo, tratando o aliviando los efectos de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular; o
- v) manteniendo o disminuyendo la presión ocular en los ojos de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular,

en donde la amiloidosis ocular se caracteriza por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario.

- 30 El sujeto a tratar puede ser un mamífero, particularmente un ser humano.

En particular, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o el anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención se une en al menos dos, particularmente en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde al menos dos de los tres sitios de unión distintos comprenden al menos dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo y al menos uno de los tres sitios de unión distintos comprende al menos un resto aminoácido.

40 Los al menos dos sitios de unión distintos que comprenden al menos dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo están situados en estrecha proximidad entre sí en el antígeno, separados y/o flanqueados por al menos un resto aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña en comparación con dichos al menos dos restos aminoácidos consecutivos, formando así un epítipo conformacional discontinuo.

45 Los al menos tres sitios de unión distintos que comprenden al menos dos restos aminoácidos consecutivos y al menos un resto aminoácido, respectivamente, que están principalmente involucrados en la unión del anticuerpo están situados en estrecha proximidad entre sí en el epítipo, separados y/o flanqueados por al menos un resto aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña en comparación con los restos aminoácidos, que están principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, formando así un epítipo conformacional discontinuo.

50 En particular, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dicho al menos uno de dichos al menos dos sitios de unión distintos comprende cada uno al menos dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos restos aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- incrustado en la siguiente secuencia central (SEQ ID NO: 9)

Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

- 5 Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña en comparación con el sitio de unión -Phe-Phe-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

- 10 Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu;

Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Asp.

- 15 En particular, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos restos aminoácidos consecutivos, respectivamente, principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos restos aminoácidos consecutivos que representan un primer sitio de unión son -Phe-Phe- y el al menos un resto aminoácido es -His- incrustado en la siguiente secuencia central:

- 20 - Xaa₁-His-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Phe-Phe-Xaa₇-Xaa₈- Xaa₉-,

En donde:

Xaa₁ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

- 25 Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₇ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa₈ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

- 30 Xaa₉ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₁, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈ y Xaa₉ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión de más pequeña a significativamente más pequeña en comparación con el -His- y el sitio de unión -Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

- 35 Xaa₃ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₄ es Lys;

Xaa₅ es Leu;

Xaa₆ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₇ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

- 40 Xaa₈ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₉ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto,

particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide, en donde dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos restos aminoácidos consecutivos que representan un segundo sitio de unión son -Lys-Leu- incrustados en la siguiente secuencia central (SEQ ID NO: 10):

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃, en donde:

Xaa₁ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña o significativamente más pequeña en comparación con el sitio de unión -Lys-Leu-.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos restos aminoácidos consecutivos, respectivamente, principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos, que están separados por al menos un resto aminoácido no involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña en comparación con los restos aminoácidos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, son -His- y -Lys-Leu-, respectivamente, incrustados en la siguiente secuencia central:

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Xaa₄- Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-, en donde:

Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₇ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

Xaa₈ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇, Xaa₈, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña o significativamente más pequeña en comparación con el -His- y el sitio de unión -Lys-Leu-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Phe;

Xaa₅ es Phe;

Xaa₆ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₇ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₈ es Glu o Asp, pero particularmente Asp.

En otra realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos dos restos aminoácidos consecutivos principalmente involucrados en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un resto aminoácido que no está involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña que dichos restos aminoácidos consecutivos, que son -Phe-Phe- y -Leu-Lys-, respectivamente, que representan un primero y un segundo sitios de unión incrustados

en la siguiente secuencia central:

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

5 Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, e Ile;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

10 Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña o significativamente más pequeña en comparación con el -Lys-Leu- y el sitio de unión -Phe-Phe-, respectivamente.

15 En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos restos aminoácidos consecutivos, respectivamente involucrados, principalmente, en la unión del anticuerpo, en donde el al menos uno y los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un resto aminoácido que no está involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña en comparación con los restos aminoácidos, los cuales están involucrados, principalmente, en la unión del anticuerpo, y en donde dichos restos aminoácidos son -His- y -Phe-Phe- y -Leu-Lys-, respectivamente, incrustados en la siguiente secuencia central:

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe e Ile;

25 Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu, Ser e Ile;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

30 Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña o significativamente más pequeña en comparación con el sitio de unión -His-, el -Lys-Leu- y el -Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

Xaa₂ es Asn o Gln, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

35 Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

Xaa₆ es Glu o Asp, pero particularmente Asp.

40 En otra realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos restos aminoácidos consecutivos involucrados, principalmente, en la unión del anticuerpo, en donde los al menos dos aminoácidos consecutivos están separados por al menos un resto aminoácido que no está involucrado en la unión del anticuerpo o en una extensión significativamente más pequeña que dichos restos aminoácidos consecutivos, los cuales son -Phe-Phe- y -Leu-Lys-, respectivamente, que representan un primero y un segundo sitios de unión incrustados en la siguiente secuencia central:

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, Lys y Arg;

Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Val, Leu e Ile;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp;

5 Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆ no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña o significativamente más pequeña en comparación con los sitios de unión -Lys-Leu- y -Phe-Phe-, respectivamente.

En otra realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde:

10 Xaa₁ es His o Arg, pero particularmente His;

Xaa₂ es Gln o Asn, pero particularmente Gln;

Xaa₃ es Val o Leu, pero particularmente Val;

Xaa₄ es Ala o Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es Glu o Asp, pero particularmente Glu; y

15 Xaa₆ es Asp o Glu, pero particularmente Asp.

En una realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos restos aminoácidos consecutivos involucrados, principalmente, en la unión del anticuerpo, los cuales son -Phe-Phe-Ala-Glu-, particularmente -Phe-Phe-Ala-, pero especialmente -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, respectivamente, y en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos presentan la secuencia de aminoácidos -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp- como se muestra en la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos His-Gln-Lys-Leu-Val- como se muestra en la SEQ ID NO: 8, respectivamente.

25 En una realización de la invención, se proporcionan un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que reconoce y se une en al menos un sitio de unión distinto, particularmente en al menos dos sitios de unión distintos, más particularmente, en al menos tres sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dicho al menos uno o dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden al menos uno y al menos dos restos aminoácidos consecutivos, respectivamente, involucrados, principalmente, en la unión del anticuerpo, los cuales son -Phe-Phe- y -Lys-Leu-, y -His-, respectivamente, en donde dichos sitios de unión distintos se incrustan en la secuencia de aminoácidos -Val-Phe-Phe-Ala-Glu-, y en la secuencia de aminoácidos -His-Gln-Lys-Leu-Val-, respectivamente.

30 En otra realización de la invención, el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, comprende un reconocimiento del antígeno y un sitio de unión que reconoce y se une en al menos dos sitios de unión distintos en la proteína β -amiloide en donde dichos al menos dos sitios de unión distintos comprenden cada uno al menos dos restos aminoácidos consecutivos en la secuencia de aminoácidos dada en las SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente, en donde dichos restos aminoácidos consecutivos, particularmente -Phe-Phe y Lys-Leu-, están, principalmente, involucrados en la unión de la proteína β -amiloide.

35 En una realización específica de la invención, los sitios de reconocimiento y de unión como se ha definido anteriormente en el presente documento están formando un epítipo conformacional discontinuo localizado en una región de la proteína β -amiloide entre el resto aminoácido 12 a 24, particularmente entre los restos 14 a 23, más particularmente entre los restos aminoácidos 14 y 20, en donde los al menos dos sitios de reconocimiento y de unión que comprenden cada uno al menos 2 restos aminoácidos, están situados en la posición 16 y 17 y en la posición 19 y 20, respectivamente, y en donde el al menos un sitio de reconocimiento y de unión distinto que comprende al menos 1 resto aminoácido está situado en la posición 14, cuyos restos están involucrados, principalmente, en la unión de la proteína β -amiloide y en donde dichos sitios de reconocimiento y de unión están al menos en un lado flanqueado por restos aminoácidos, particularmente los restos 21 y 22, y separados por un resto aminoácido situado en la posición 15 y 18, cuyos restos aminoácidos no están involucrados directamente en la unión del antígeno o, al menos, en una extensión sustancialmente más pequeña.

40 Todavía en otra realización de la invención, los dichos al menos tres sitios de reconocimiento y de unión distintos están flanqueados en ambos lados por restos aminoácidos, particularmente los restos 12 y 13, y los restos 21 y 22 y están separados por un resto aminoácido situado en la posición 15 y 18, cuyos restos aminoácidos no están directamente involucrados en la unión del antígeno o, al menos, en una extensión sustancialmente más pequeña.

En una realización específica, dichos restos aminoácidos consecutivos, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, los cuales están involucrados, principalmente, en la unión de la proteína β -amiloide, se incrustan en la siguiente región central:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

- 5 En otra realización específica, dichos restos aminoácidos, particularmente -Lys-Leu- en la posición 16 y 17 y -Phe-Phe- en la posición 19 y 20, y -His- en la posición 14, que están involucrados, principalmente, en la unión de la proteína β -amiloide, se incrustan en la siguiente región central:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp-	Val-	Gly-
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25

- 10 En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, particularmente dos CDR de origen no humano, más particularmente tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones marco derivadas de humano o de primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un fragmento de anticuerpo de origen humano o primate, cuyo anticuerpo o fragmento humanizado del mismo es capaz de reconocer y unirse, específicamente, a la proteína β -amiloide, más particularmente a un péptido monomérico β -amiloide, más particularmente a un péptido polimérico β -amiloide, incluso más particularmente a fibras, fibrillas o filamentos β -amiloide en forma aislada o como parte de una placa de β -amiloide, en un epítipo que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11):

Xaa₁-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

Xaa₁ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Asn, Gln, pero particularmente His;

- 20 Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero particularmente Val;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu;

Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Asp.

- 25 Todavía en otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente, al menos una CDR de origen no humano, particularmente dos CDR de origen no humano, más particularmente tres CDR de origen no humano, incrustadas en una o más regiones marco de origen humano o primate y, opcionalmente, una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o primate, cuyo anticuerpo o fragmento del mismo humanizado es capaz de reconocer y unirse específicamente a la proteína β -amiloide, particularmente un péptido monomérico β -amiloide, más particularmente un péptido polimérico β -amiloide, incluso más particularmente fibras, fibrillas o filamentos β -amiloides en forma aislada o como parte de una placa β -amiloide, en un epítipo que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

His-Xaa₂-Lys-Leu-Xaa₃-Phe-Phe-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆, en donde:

- 35 Xaa₂ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, pero particularmente Gln; y

Xaa₃ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Val, Leu, e Ile, pero particularmente Val;

Xaa₄ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Val, pero particularmente Ala;

Xaa₅ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu;

- 40 Xaa₆ es un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, pero particularmente Glu; y en donde dichos restos aminoácidos Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅, Xaa₆, no están involucrados en la unión del anticuerpo o en una extensión más pequeña en comparación con el sitio de unión -His- y el Lys-Leu- y el -Phe-Phe-.

En una realización específica de la invención, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo de donante, pero particularmente de un anticuerpo de donante murino, criado contra un fragmento de antígeno que no contiene

dicho sitio de unión distinto. Este cambio en la región epitópica puede haber sido causado al menos en parte por el uso de un constructo antígeno supramolecular que comprende un péptido antígeno que corresponde a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente del péptido β -amiloide $A\beta_{1-16}$, modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), en donde dicho resto hidrófilo está enlazado covalentemente con cada uno de los extremos del péptido antígeno a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido capaz de servir como un dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófilo al fragmento peptídico, como se describe más adelante en el presente documento en el proceso de inmunización. Cuando se utiliza un PEG como resto hidrófilo, los extremos PEG libres se unen covalentemente a la fosfatidiletanolamina o a cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar el constructo antígeno en la bicapa de un liposoma como se describe en el presente documento.

En particular, la CDR de origen no humano se obtiene de un anticuerpo de donante murino que presenta las propiedades características de ACI-01-Ab7C2 (también denominado "mC2" a lo largo de solicitud) depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturem GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con el n.º de acceso DSM ACC2750).

En una realización de la invención, la CDR de origen no humano se obtiene de anticuerpo de donante murino ACI-01-Ab7C2 (también denominado "mC2" a lo largo de la solicitud) depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturem GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Branuschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con el n.º de acceso DSM ACC2750).

También el uso de lípido A como parte del protocolo de inmunización puede haber contribuido a un cambio en la región epitópica.

En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrado en regiones marco de origen humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 2 que representa CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende, integrado en regiones marco de cadena pesada de origen humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende, integrado en regiones marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) que comprende, integrado en regiones marco de origen humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En otra realización específica, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende, integrado en regiones marco de origen humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos, cuyos péptidos son diferentes y presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo. En particular, si las al menos dos CDR presentes son ambas CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), al menos una de dichas CDR debe ser CDR1 representada por la SEQ ID NO: 4.

También comprendido por la invención es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco de cadena pesada de origen humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

5 En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende, integrados en regiones marco derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

10 En una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco de cadena ligera derivada de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

15 En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), que ha integrado en regiones marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo y, en particular, al menos una de dichas CDR debe ser la CDR1 representada por la SEQ ID NO: 4.

20 La invención se refiere también a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco de cadena pesada derivada de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

25 En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) que comprende, integrados en regiones marco de cadena pesada derivada de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

30 La invención comprende también un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco de cadena pesada derivada de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

35 En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) que comprende, integrados en regiones marco de cadena ligera derivada de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), particularmente en el orden indicado anteriormente.

40 La invención se refiere también a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco derivadas de humano o primate, al menos tres péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

45 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo, cuyo anticuerpo comprende, integrados en regiones marco derivadas de humano o primate, al menos cuatro péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el anticuerpo.

55 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco de origen humano o primate, al menos cinco péptidos con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste en la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR), pero particularmente un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo en donde la misma CDR no puede estar presente dos veces en el

anticuerpo.

5 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado o a un fragmento del mismo que comprende, integrados en regiones marco derivadas de humano o primate, péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) y la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1, la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

10 En una realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR), o a un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo humanizado, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de la misma comprende, integrado en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

15 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o a un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo humanizado, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o un fragmento de la misma comprende, integrado en regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos un péptido con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

20 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o a un fragmento de la misma, cuyo anticuerpo, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende, integrados en las regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1 y la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

25 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o a un fragmento de la misma, cuyo anticuerpo, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende, integrados en las regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

30 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a una Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o a un fragmento de la misma, cuyo anticuerpo, la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) o fragmento de la misma comprende, integrados en las regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 y la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

35 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o a un fragmento de la misma, cuyo anticuerpo, la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o fragmento de la misma comprende, integrados en las regiones marco de cadena pesada derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 y la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

40 En otra realización específica, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento de la misma, cuyo anticuerpo, la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) o un fragmento de la misma comprende, integrados en regiones marco de cadena ligera derivadas de humano o primate, al menos dos péptidos con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 y la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

45 La invención comprende además un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde tanto la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) como la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) del anticuerpo C2 de ratón cada una contribuye con al menos una de sus regiones CDR a al menos dos regiones CDR del anticuerpo humanizado. El anticuerpo humanizado resultante o un fragmento del mismo puede, por ello, comprender:

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 (LCVR);

50 -al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 (LCVR);

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 que representa la CDR1 (LCVR);

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 (LCVR);

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que representa la CDR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 (LCVR);

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que representa la CPR2 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 (LCVR);

5 -al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que representa la CDR1 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 (LCVR);

-al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 que representa la CDR2 (LCVR);

10 -al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 que representa la CDR3 (HCVR) en combinación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 que representa la CDR3 (LCVR).

Todavía en otra realización, la invención se refiere un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera y/o de cadena pesada de origen humano o primate.

15 En una realización adicional, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos uno, particularmente al menos uno pero no más de 5, más particularmente al menos uno pero no más de 4, incluso más particularmente al menos uno pero no más de 3, pero especialmente al menos uno pero no más de 2, de los aminoácidos representativos de las regiones CDR de cadena ligera y/o de cadena pesada dadas en las SEQ ID NO: 1-6 es modificada a través de una sustitución conservadora de manera que el anticuerpo mantiene toda su funcionalidad.

20 En particular, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde en la CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) dada en la SEQ ID NO: 5, el Lys en la posición 50 de Kabat es reemplazado por un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln y Glu, particularmente por Arg.

25 En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde en la CDR2 dada en la SEQ ID NO: 5, el Lys en la posición 50 de Kabat es reemplazado por un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln Glu, particularmente por Arg.

30 En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde en la CDR2 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) dada en la SEQ ID NO: 5, el Ser en la posición 53 de Kabat es reemplazado por un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

En particular, la invención se refiere a una Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en donde en la CDR2 dada en la SEQ ID NO: 5, el Ser en la posición 53 de Kabat es reemplazado por un resto aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn o Thr, pero particularmente por Asn.

35 En una realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90 %, particularmente 95 %, más particularmente 98 %, idéntica a la secuencia dada en las SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

40 En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90 %, particularmente 95 %, más particularmente 98 %, idéntica a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente.

45 Todavía en otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90 %, particularmente 95 %, más particularmente 98 % idéntica a la región CDR correspondiente dada en las SEQ ID NO: 1-3.

50 En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, en donde al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90 %, particularmente 95 %, más particularmente 98 %, idéntica a la región CDR correspondiente dada en las SEQ ID NO: 4-6.

Todavía en otra realización, la invención se refiere un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia dada en

las SEQ ID NO: 15 y 16, respectivamente.

5 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o a un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento en donde la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tiene una secuencia de aminoácidos que es 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia dada en las SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente.

10 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde al menos una, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la región de CDR correspondiente dada en las SEQ ID NO: 1-3.

15 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde al menos una, particularmente al menos dos, pero especialmente tres, de las regiones CDR de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR) tienen una secuencia de aminoácidos que es 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, idéntica a la región CDR correspondiente como se proporciona en la SEQ ID NO: 4-6.

20 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en donde al menos uno de los aminoácidos representativos de las secuencias marcoceptoras obtenidas de las secuencias V_H y V_K de línea germinal humana, se cambia, respectivamente, a través de una sustitución a un aminoácido de la región correspondiente del anticuerpo murino ACI-01-Ab7C2 o a una sustitución conservadora del mismo.

25 En particular, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu.

30 La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado, en donde el Arg en posición 94 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

35 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu, y el Arg en la posición 94 de Kabat es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

40 La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado, en donde el Gln en la posición 45 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por un grupo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln, y Asn, particularmente por Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

45 La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado, en donde el Leu en la posición 50 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, Gln y Asn, particularmente por Lys y Arg, pero especialmente por Lys.

50 La invención se refiere además a un anticuerpo humanizado, en donde el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por un grupo aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

55 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Asn en la posición 53 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 puede ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Lys y Arg, pero especialmente por

His y Gln.

5 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu, y el Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser, y el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenido de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Phe, Leu, Val, Ile, y Ala, particularmente por Leu y Phe, pero especialmente por Phe.

15 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente Leu e Ile, pero especialmente Leu.

20 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Thr, pero especialmente por Ser.

25 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por Leu e Ile, pero especialmente por Leu, y el Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por Ser.

30 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por Phe.

35 Todavía en otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado, en donde el Trp en la posición 47 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por Leu e Ile, pero especialmente Leu, y el Arg en la posición 94 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de las secuencias V_H de la línea germinal humana del subgrupo V_{HIII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 es reemplazado por Ser, y el Tyr en la posición 87 de Kabat en la secuencia marco aceptora obtenida de secuencias V_K de la línea germinal humana del subgrupo V_{KII} de KABAT de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 es reemplazado por Phe.

En una realización específica, la invención se refiere a la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12.

40 En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12.

En una realización específica, la invención se refiere a la región variable de cadena ligera que incluye secuencias de señal mostradas en la SEQ ID NO: 13.

45 En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena ligera completa que incluye secuencias de señales mostradas en la SEQ ID NO: 13.

En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 y la región constante de cadena ligera de la SEQ ID NO: 14.

50 En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena ligera completa de la SEQ ID NO: 13 y la región constante de cadena ligera de la SEQ ID NO: 14.

En una realización específica, la invención se refiere a la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15.

En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15.

En una realización específica, la invención se refiere a la región variable de cadena pesada que incluye secuencias

de señales mostradas en la SEQ ID NO: 16.

En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada completa que incluye secuencias de señales mostradas en la SEQ ID NO: 16.

5 En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 y la región constante de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17.

En otra realización específica de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado, que comprende la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 16 y la región constante de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17.

10 En una realización, el anticuerpo humanizado según la invención y como se ha descrito en el presente documento, después de la co-incubación con un péptido monomérico $A\beta$ que tiene al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 restos aminoácidos y/o un péptido $A\beta$ amiloide polimérico soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$, pero especialmente con un péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o un péptido $A\beta$ polimérico amiloide soluble que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta_{1-42}$, particularmente en una relación de concentración molar de anticuerpo con respecto a $A\beta_{1-42}$ de hasta 1:1.000, pero especialmente en una relación de concentración molar de entre 1:10 y 15 1:100, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ con fibrillas polímeras de alto peso molecular.

En particular, la co-incubación del anticuerpo según la invención con péptidos monomérico amiloide y/o polimérico amiloide soluble se lleva a cabo desde 24 horas hasta 60 horas, particularmente desde 30 horas hasta 50 horas, más particularmente durante 48 horas, pero especialmente 24 horas, a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

20 En una realización específica de la invención, la co-incubación con péptidos monomérico amiloide y/o polimérico amiloide soluble se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

25 En particular, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se une al péptido monomérico $A\beta$ y/o al péptido amiloide soluble polimérico $A\beta$ que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$, y después de la co-incubación con péptido monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o péptido amiloide soluble polimérico $A\beta$ que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta_{1-42}$ inhibe la agregación de los monómeros y/o polímeros $A\beta$ con las fibrillas polímeras de alto peso molecular.

30 En una realización, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o polímeros solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$ con fibrillas polímeras de alto peso molecular de al menos 50 %, particularmente al menos 60 %, particularmente al menos 65 %, más particularmente al menos 75 %, incluso más particularmente al menos 80 %, pero especialmente en al menos un 85 %-90 %, o más si se compara con los respectivos péptidos monómeros amiloides incubados en tampón (control), a una relación de concentración molar de anticuerpo con relación a $A\beta_{1-42}$ de hasta 1:1.000, particularmente a una 35 relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:100, pero especialmente a una relación de concentración molar de 1:10.

40 En una realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o de los polímeros solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$ con fibrillas polímeras de alto peso molecular en al menos un 30 % a una relación de concentración molar de anticuerpo con respecto a $A\beta_{1-42}$ de 1:100.

45 En otra realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ y/o de los polímeros solubles $A\beta$ que comprenden una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$ con fibrillas polímeras de alto peso molecular en al menos un 80 % a una relación de concentración molar de anticuerpo con respecto a $A\beta_{1-42}$ de 1:10.

50 La unión de los anticuerpos, según la invención y como se ha descrito en el presente documento, con péptidos amiloidogénicos monómeros y/o polímeros pero, en particular, con la forma amiloide (1-42) conduce a la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monómeros y/o polímeros con fibrillas o filamentos de alto peso molecular. A través de la inhibición de la agregación de los péptidos amiloidogénicos monómeros y/o polímeros los anticuerpos según la presente invención son capaces de impedir o ralentizar la formación de placas amiloides, particularmente la forma amiloide (1-42), que se sabe se vuelve insoluble por el cambio de conformación secundaria y es la parte principal de las placas amiloides en el cerebro de animales y seres humanos enfermos.

55 La potencial inhibición de la agregación del anticuerpo según la invención se puede determinar por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, particularmente mediante ultracentrifugación por gradiente de

densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado y/o mediante un ensayo de fluorescencia mediante tioflavina T (Th-T).

5 En una realización, la invención se refiere a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado como se ha descrito en el presente documento que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, cuyo anticuerpo, después de la co-incubación, particularmente a una relación de concentración molar de entre 1:10 y 1:1.000, más particularmente a una relación de 1:100 con fibrillas o filamentos amiloides polímeros de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monómeros $A\beta$ que tienen al menos 30, particularmente al menos 35, más particularmente al menos 38, incluso más particularmente al menos 40 restos aminoácidos y, pero especialmente péptidos monómeros $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos polímeros preformados en al menos un 20 %, particularmente en al menos un 30 %, más particularmente en al menos un 35 %, incluso más particularmente en al menos un 40 %, pero especialmente en al menos un 50 % o más.

En una realización específica de la invención, la inhibición de la agregación y la potencial desagregación del anticuerpo, respectivamente, está determinada por ultracentrifugación por gradiente de densidad seguido de un análisis de sedimentación SDS-PAGE en un gradiente preformado.

15 En otra realización específica de la invención, la inhibición de la agregación y la potencial desagregación del anticuerpo, respectivamente, es determinada por el ensayo de fluorescencia mediante tioflavina T (Th-T).

En otra realización específica, el anticuerpo según la invención es co-incubado con amiloide, fibrillas o filamentos amiloides polímeros de alto peso molecular preformados durante 12 horas a 36 horas, particularmente durante 18 horas a 30 horas, más particularmente durante 24 horas a una temperatura de entre 28 °C y 40 °C, particularmente de entre 32 °C y 38 °C, más particularmente a 37 °C.

En particular, la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides polímeros de alto peso molecular preformados se realiza durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

En una realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos polímeros preformados en al menos un 24 % con una relación de concentración molar de anticuerpo con respecto a $A\beta_{1-42}$ de 1:100.

En otra realización específica de la invención, el anticuerpo, particularmente el anticuerpo humanizado según la invención que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos polímeros preformados en al menos un 32 % a una relación de concentración molar de anticuerpo con respecto a $A\beta_{1-42}$ de 1:10.

A través de la desagregación de fibrillas o filamentos amiloidogénicos polímeros los anticuerpos según la presente invención son capaces de impedir o ralentizar la formación de placas amiloides lo cual conduce a un alivio de los síntomas asociados con la enfermedad y un retraso o reversión de su progresión.

En consecuencia, una realización adicional de la invención es proporcionar un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo como se ha descrito en el presente documento, cuyo anticuerpo es capaz de disminuir la cantidad total de $A\beta$ en el cerebro de un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que está aquejado de una enfermedad o estado que conduce a un aumento de la concentración de $A\beta$ en el cerebro.

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo humanizado según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo es bi-eficaz en que exhibe tanto una propiedad de inhibición de la agregación como también una propiedad de desagregación, particularmente emparejada con un alto grado de sensibilidad conformacional.

En particular, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo, después de la co-incubación con péptidos amiloides solubles monómeros y/o polímeros, particularmente con péptidos monómeros β -amiloides tal como, por ejemplo, péptidos monómeros $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, 1-42 o, y/o un péptido β -amiloide soluble polimérico que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta$, pero especialmente con un péptido amiloide soluble monomérico $A\beta_{1-42}$ y/o polimérico $A\beta$ que comprende una pluralidad de dichas unidades monómeras $A\beta_{1-42}$, inhibe la agregación de los monómeros $A\beta$ en fibrillas o filamentos polímeros de alto peso molecular y, además, después de la co-incubación con fibrillas o filamentos amiloides polímeros de alto peso molecular preformados formados por la agregación de péptidos monómeros amiloides, particularmente péptidos monómeros β -amiloides tales como, por ejemplo, péptidos monómeros $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41 o 1-42, pero especialmente péptidos monómeros $A\beta_{1-42}$, es capaz de desagregar las fibrillas o filamentos polímeros preformados.

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o a un anticuerpo

humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo es capaz de inducir una transición de la conformación β en lámina hacia una conformación α en hélice y/o en espiral al azar, pero particularmente una conformación en espiral al azar, incluso más particularmente una conformación en espiral al azar en una ubicación dada en la molécula, especialmente en el entorno de Tyr 10 y Val 12 de la proteína $A\beta$, que conduce a un aumento de la conformación en espiral al azar a expensas de la conformación β en lámina y una mejorada solubilización de las fibrillas o filamentos amiloides polímeros de alto peso molecular preformados. En particular, la disminución de la conformación β en lámina equivale a al menos el 30 %, particularmente a al menos el 35 %, y más particularmente a al menos 40 % y más si se compara con las respectivas fibrillas o filamentos polímeros amiloides preformados incubados en tampón (control).

El potencial del anticuerpo en la inducción de una transición en la estructura secundaria es determinado por espectroscopia de RMN ^{13}C de estado sólido pero, en particular, midiendo las intensidades integrales de las conformaciones de Tyr 10 y Val 12 $C\beta$ en el péptido $A\beta_{1-42}$.

En una realización adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que comprenden al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo o fragmento se une a un monómero $A\beta$ con una afinidad de unión desde al menos aproximadamente 1×10^{-7} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-12} , particularmente desde al menos aproximadamente 1×10^{-8} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-11} , más particularmente desde al menos aproximadamente 1×10^{-9} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-10} , incluso más particularmente desde al menos aproximadamente 1×10^{-8} hasta al menos aproximadamente 2×10^{-8} , pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora del amiloide (APP).

En otra realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma, en donde dicho anticuerpo o fragmento se une a fibras, fibrillas o filamento de $A\beta$ con una afinidad de unión desde al menos aproximadamente 1×10^{-7} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-12} , particularmente desde al menos aproximadamente 1×10^{-8} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-11} , más particularmente desde al menos aproximadamente 1×10^{-9} hasta al menos aproximadamente 1×10^{-10} , incluso más particularmente desde al menos aproximadamente 2×10^{-9} hasta al menos aproximadamente 5×10^{-9} , pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora del amiloide (APP).

En otra realización, el anticuerpo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento o un fragmento del mismo, exhibe una afinidad de unión a una fibra, fibrilla o filamento de $A\beta$ que es al menos 10 veces, particularmente al menos 15 veces, más particularmente al menos 20 veces, pero especialmente al menos 25 veces mayor que la afinidad de unión a un monómero $A\beta$.

Todavía en otra realización, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo se une sustancialmente al agregado $A\beta$, que incluye placas de $A\beta$, en el mamífero, particularmente el cerebro humano pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora del amiloide (APP).

En otro aspecto de la invención, se proporciona el anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo se une sustancialmente al amiloide polimérico soluble, particularmente amiloide β ($A\beta$) que incluye monómeros $A\beta$, en los mamíferos, particularmente el cerebro humano pero, preferiblemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con la proteína precursora del amiloide (APP).

Además se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, cuyo anticuerpo reduce significativamente la carga de placa de $A\beta$ en los mamíferos, particularmente el cerebro humano. Esto puede lograrse bien por unión del anticuerpo a la placa o cambiando el equilibrio entre amiloide, particularmente amiloide β ($A\beta$), en su estado insoluble y agregado hacia su forma soluble mediante la desagregación de las fibras a formas polímeras y monómeras solubles al inducir un cambio en la conformación y unir y estabilizar las formas de amiloide desagregadas y solubilizadas, particularmente las formas de amiloide β ($A\beta$), en el tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, particularmente un mamífero, e incluso más particularmente un ser humano, y en particular en el cerebro del sujeto. A través de la actividad del anticuerpo según la invención, se ven favorecidos, por ello, el aclaramiento y el catabolismo periféricos en lugar de la deposición en el tejido y/o fluidos corporales del sujeto, particularmente el cerebro. El efecto beneficioso del anticuerpo según la invención puede, por ello, obtenerse sin la unión del anticuerpo a la placa.

A través de esta actividad estabilizadora, el anticuerpo según la invención es capaz de neutralizar los efectos tóxicos

de la proteína amiloide soluble polímera y menos agregada, particularmente la proteína amiloide β ($A\beta$), en el tejido y/o fluidos corporales de un sujeto, particularmente un mamífero, e incluso más particularmente un ser humano, y en particular en el cerebro del sujeto. En una realización específica de la invención, el anticuerpo según la invención puede lograr, de ese modo, sus efectos beneficiosos sin necesariamente unir la amiloide beta agregada en el cerebro del sujeto.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la presente invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que comprende al menos una cadena ligera o un fragmento de la misma o al menos una cadena pesada o un fragmento de la misma que incorpora al menos uno, particularmente dos y más particularmente tres regiones CDR obtenidas de un anticuerpo donante de ratón, particularmente de anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón (denominado "mC2", y "hC2" para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) depositado el 1 diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo tiene una afinidad por el antígeno $A\beta$ que es al menos 5 veces, particularmente al menos 8 veces, más particularmente al menos 10 veces, al menos, pero especialmente al menos 15 veces mayor que la del anticuerpo donante de ratón.

El anticuerpo de esta invención puede ser, en una realización, un anticuerpo completo (p. ej., con dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa) de cualquier isotipo y subtipo (por ejemplo, IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 e IgA2); pero especialmente un anticuerpo del isotipo IgG4; alternativamente, en otra realización, puede ser un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, y Fv) de un anticuerpo completo.

La invención se refiere, además, también, a fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento. En una realización de la invención, el fragmento se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab)_2$ fragmento, y un fragmento Fv, que incluye los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se conjuga con polietilenglicol. Aún en otra realización, la región constante del anticuerpo de la invención es modificada para reducir al menos una función efectora biológica mediada en la región constante relativa a un anticuerpo no modificado. Todavía en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención comprende una región Fc que tiene una función efectora alterada.

La invención se refiere además a una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En particular, la invención se refiere a una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos dado en las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente, o la secuencia complementaria, que representan Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) 2 y 3 de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

Más particularmente, la invención se refiere a una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tramo de moléculas de aminoácidos contiguos dado en la SEQ ID NO: 4, o la secuencia complementaria, que representa la Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) 1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como la dada en la SEQ ID NO: 18 y en la SEQ ID NO: 19, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de aminoácidos de la CDR 2 y CDR 3, respectivamente, de la Región Variable de Cadena Pesada (HCVR).

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como la dada en la SEQ ID NO: 20, o la secuencia complementaria, que codifica la secuencia de nucleótidos de CDR 1 de la Región Variable de Cadena Ligera (LCVR).

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 21, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de cadena ligera.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 22, o la secuencia complementaria, que codifica la región variable de cadena ligera completa que incluye secuencias de señales.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22 y la región constante de cadena ligera de la SEQ ID NO: 23. La invención comprende también la cadena complementaria de dicha molécula de

nucleótidos.

En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 24 que codifica la región variable de cadena pesada. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

- 5 En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 25 que codifica la región variable de cadena pesada completa que incluye secuencias de señales. La invención también comprende la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

10 En otra realización de la invención, se proporciona una molécula de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 y la región constante de cadena pesada de la SEQ ID NO: 26. La invención comprende también la cadena complementaria de dicha molécula de nucleótidos.

15 También comprendida por la presente invención es una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una de las secuencias de nucleótidos de la invención que codifican anticuerpos anteriormente descritos, particularmente con la cadena complementaria de la misma, ya sea en forma aislada o como parte de la molécula de nucleótidos de mayor tamaño.

En particular, la invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones de hibridación convencionales, particularmente en condiciones de hibridación rigurosas, con cualquiera de las secuencias de nucleótidos dadas en las SEQ ID NO: 18-26 y 29-32, particularmente con la cadena complementaria de la misma.

20 En otra realización de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención y como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

En otra realización de la invención se proporciona una célula que comprenden un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la invención y como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

25 Todavía en otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular una composición que es una composición farmacéutica o terapéutica, que comprende, además, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otra realización de la invención, dicha composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

35 Compreendida, además, por la invención está una composición que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, una sustancia adicional biológicamente activa y/o un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

40 En particular, la invención se refiere a una composición o mezcla, en donde la sustancia adicional biológicamente activa es un compuesto utilizado en la medicación de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína amiloide o de tipo amiloide tal como la proteína $A\beta$ involucrada en la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización de la invención, la otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ser también un agente terapéutico que se puede utilizar en el tratamiento de la amiloidosis causada por amiloide β o puede utilizarse en la medicación de otros trastornos neurológicos.

45 La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por el mismo o similar mecanismo que el del anticuerpo según la invención o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

50 En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolina esterasa, bloqueantes del canal del calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepina, síntesis de acetilcolina, potenciadores de almacenamiento o liberación, agonistas de los receptores postsinápticos de acetilcolina, inhibidores de la monoamina oxidasa-A o -B, antagonistas del receptor de glutamato N-metil-D-aspartato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas de los receptores serotoninérgicos.

Más particularmente, la invención se refiere a una composición o mezcla que comprende al menos un compuesto

5 seleccionado del grupo que consiste en compuestos eficaces contra el estrés oxidativo, los compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de α -secretasa, inhibidores de β -secretasa y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, interruptores β en lámina, sustancias atrayentes de componentes celulares que aclaran/disminuyen la amiloide beta, inhibidores de la amiloide beta truncada N-terminal que incluye beta 3-42 amiloide piroglutamada, moléculas antiinflamatorias, o inhibidores de la colinesterasa (ChEI) tal como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco y suplementos nutritivos que modifiquen amiloide o tau, y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

10 La invención se refiere además a una composición o mezcla, en donde el compuesto es un inhibidor de la colinesterasa (ChEI), particularmente una mezcla, en donde el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina, niacina y memantina.

15 En una realización adicional, las composiciones según la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

20 Todavía en otra realización de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden "antipsicóticos atípicos" como la clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina, para el tratamiento de los síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (que se manifiesta por una marcada incoherencia, descarrilamiento, tangencialidad), y el comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, afecto plano, apatía, y aislamiento social, junto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito en el presente documento y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 Otros compuestos que se pueden utilizar adecuadamente en mezclas en combinación con el anticuerpo según la presente invención se describen en el documento WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17) que incluyen dianas para fármacos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácidos alcanolsulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de la colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores del colesterol (páginas 68-75); inhibidores de la amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), antipsicóticos y antidepresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89 páginas) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

40 En otra realización, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

45 La invención se refiere, además, al uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide, incluidas la amiloidosis secundaria y la amiloidosis asociada a la edad, y los trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo Parkinson-Demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan o están asociadas con proteínas de tipo amiloide, tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluidas las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y a degeneración macular, por ejemplo la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a

drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

También comprendido por la presente invención está un procedimiento para la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprenden dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente eficaz, que comprenden la formulación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable, para uso en un procedimiento de prevención, tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide, incluidas la amiloidosis secundaria y la amiloidosis debida a la edad, y los trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo Parkinson-Demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide, tal como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluidas las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a catarata debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y a degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

Además comprendido por la presente invención es un procedimiento para la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide incluidas la amiloidosis secundaria y la amiloidosis asociada a la edad, y los trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés), el complejo Parkinson-Demencia de Guam, así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas a proteínas de tipo amiloide, tal como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple; la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, la enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), la Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluidas las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de la beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, mediante la administración de un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, más particularmente un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende un anticuerpo y/o una parte funcional de la misma, con un sujeto, incluido un mamífero, o un ser humano afectado por un trastorno de este tipo, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Un objeto de la invención es también proporcionar un procedimiento para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye la amiloidosis secundaria y la amiloidosis debida a la edad que incluye pero que no se limita a los trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a las deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, mediante la administración al sujeto, particularmente un mamífero o un ser humano afectado por un trastorno de este tipo, de un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica según la invención y como se ha descrito en el presente documento.

En una realización específica, la invención proporciona un procedimiento para mantener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, para la restauración de la capacidad de memoria cognitiva de un sujeto,

particularmente un mamífero o un ser humano, que padece deterioro de la memoria mediante la administración al sujeto, particularmente a un mamífero o ser humano que lo necesite, de un anticuerpo, particularmente una composición farmacéutica o terapéutica según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

- 5 Un objeto adicional de la invención es proporcionar una composición terapéutica y un procedimiento para producir una composición de este tipo así como un procedimiento para el tratamiento de la amiloidosis, grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis debida a la edad que incluyen pero sin limitarse a trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD) y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

La invención se refiere además a un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad o estado asociado con la amiloide que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de:

- (a) poner en contacto la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y/o una parte funcional del mismo, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la proteína amiloide;
- (b) permitir que el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica del sujeto.

También está comprendido un procedimiento para determinar la magnitud de la carga de placa amiloidogénica en un tejido y/o fluidos corporales que comprende

- (a) obtener una muestra representativa del tejido y/o de los fluidos del cuerpo bajo investigación;
- (b) ensayar dicha muestra para la presencia de proteína amiloide con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, más particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y/o una parte funcional del mismo;
- (c) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la proteína; y
- (d) calcular la carga de la placa en el tejido y/o en los fluidos corporales.

En particular, la invención se refiere a un procedimiento para determinar la extensión de la carga de placa amiloidogénica en un tejido y/o fluidos corporales que lo necesiten, en donde en la etapa c) se determina la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otra realización de la invención, se proporciona un kit de ensayos para la detección y diagnóstico de enfermedades y estados asociados con la amiloide en un sujeto que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y/o una parte funcional del mismo.

En particular, la invención se refiere a un kit de ensayos para la detección y diagnóstico de enfermedades y estados asociados a la amiloide que comprende un recipiente que contiene uno o más anticuerpos según la presente invención, y/o una parte funcional de los mismos, y las instrucciones para el uso de los anticuerpos con el fin de unirse a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos y composiciones para la prevención, tratamiento o detección de una enfermedad asociada con la amiloidosis en un sujeto que lo necesite utilizando inmunoglobulinas como se ha descrito en el presente documento que comprende además una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácido con relación a una región Fc de tipo salvaje. La región Fc hace de intermedio en la función efectora del anticuerpo o de un fragmento del mismo. Modulando la capacidad de la parte Fc del anticuerpo o de un fragmento del mismo para unirse o activar su receptor, es posible anular o potenciar la función efectora del anticuerpo o de un fragmento del mismo.

Así, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que comprende además una región Fc variante que comprende al menos una mutación de aminoácido que disminuye la función efectora. En un aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido disminuye la glicosilación del anticuerpo o de un fragmento del mismo. En otro aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido disminuye la unión a un receptor Fc cognado. En otro aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido disminuye la activación de un receptor Fc cognado tras la unión del anticuerpo o fragmento del mismo. En un aspecto de este tipo, la región Fc variante es una región Fc de la IgG variante. En un aspecto de este tipo, el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una mutación D265A en la región Fc.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que comprende además una región Fc variante que comprende al menos una mutación de aminoácido que aumenta la función efectora. En un aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido potencia la glicosilación del anticuerpo o fragmento del mismo. En otro aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido aumenta la unión a un receptor Fc cognado. En otro aspecto de este tipo, la mutación de al menos un aminoácido aumenta la activación de un receptor Fc cognado tras la unión del anticuerpo o fragmento del mismo. Estos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes después de una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 (Ejemplo 2): Vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo quimérico.

Figura 2 (Ejemplo 2): Vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo quimérico.

Figuras 3-1 y 3-2 (Ejemplo 2): Casete de expresión de la región variable de cadena ligera de ratón del anticuerpo quimérico.

Figuras 4-1 y 4-2 (Ejemplo 2): Casete de expresión de la región variable de cadena pesada de ratón del anticuerpo quimérico.

Figura 5 (Ejemplo 5.2): Comparación de la región variable de cadena pesada de ratón con la secuencia más cercana de la línea germinal de murino.

Figura 6 (Ejemplo 8): Actividad de los anticuerpos C2 humanizados purificados.

Figura 7 (Ejemplo 9): Actividad de unión de los anticuerpos producidos por la expresión transitoria de constructos CDRL2 modificados con C2 junto con la cadena pesada quimérica C2, en comparación con el anticuerpo quimérico C2ChVHAF/ChVK, producido por transfección transitoria y anticuerpo purificado.

Figura 8 (Ejemplo 11): Resultados del Ensayo de Unión Inmunohistoquímica con el anticuerpo quimérico AF (IgG4) y el anticuerpo humanizado H4K1 (IgG4).

Figura 9 (Ejemplo 12): Funcionalidad de mC2 en fibras Amiloides. (A) Comparación de espectros de ^{13}C CPMAS y ajustes para fibras β_{1-42} amiloides marcadas U- ^{13}C Tyr10 y Val12 incubadas con PBS (la de la izquierda sirvió como control) o ACI-7-C2 (derecha) durante 24 horas y después liofilizadas. El pico a c33 ppm corresponde a la conformación beta en lámina de las fibras, mientras que el pico a 30 ppm es un resultado de la conformación en espiral al azar. (B) Comparación de los parámetros ajustados para las dos conformaciones de $\text{C}\beta$ Val12. Los desplazamientos químicos ajustados para las dos conformaciones son bastante similares las intensidades integrales son muy diferentes, reflejando una reducción en la conformación beta en lámina original de aproximadamente un 35 % (1-(53,5/81,7)), de acuerdo con el valor obtenido a partir de la medición de fluorescencia.

Figura 10 (Ejemplo 12): Afinidad de unión de C2 humanizado en ELISA.

Figura 11 (Ejemplo 14): Unión específica de conformación de mC2 para diferentes clases de Proteína Amiloide. La preparación en gránulos en la leyenda de esta figura se refiere a fibras $\text{A}\beta_{1-42}$, la preparación sobrenadante se refiere a monómeros amiloides.

Figura 12: Secuencias VK de C2 humanizado en comparación con secuencia de murino y secuencias aceptoras humanas DPK15 y J κ 1

Figura 13: Secuencias VH de C2 humanizado en comparación con secuencia de murino y secuencias aceptoras

humanas DP54 y J_H6.

Figuras 14-1 y 14-2: ADN completo y secuencia de la proteína de la región variable de cadena ligera del anticuerpo C2 humanizado, C2HuVK1.

5 Figuras: 15-1 a 15-10: ADN completo y secuencia de la proteína de la región constante de cadena ligera (Kappa C humana) del anticuerpo C2 humanizado.

Figuras 16-1 a 16-4: ADN completo y secuencia de la proteína de la región constante de cadena pesada (Ser228-pro de IgG4 humana) del anticuerpo C2 humanizado.

10 Figuras 17A-C (Ejemplo 15): Mapeo de epítomos de anticuerpo monoclonal humanizado hC2 realizado por ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (A) Unión de hC2 para solapar péptidos de A β ₁₋₄₂. La unión a la A β ₁₋₄₂ completa y la unión a un anticuerpo de control quimérico sin unir se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente. El número del péptido corresponde al aminoácido en la secuencia A β ₁₋₄₂ en la que comienza el péptido. (B) Unión de hC2 a la A β ₁₋₄₂ y a la A β ₁₂₋₂₀ sustituida con alanina. La unión a la A β ₁₋₄₂ completa se utilizó como control positivo. El número del péptido corresponde al aminoácido que es reemplazado por alanina. (C) Unión de hC2 a los péptidos A β 13-21 13-21G21, 14-22, 14-22A22, 15-23 y 15-23A23. La unión a la A β ₁₋₄₂ completa se utilizó como control positivo.

Figura 18 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayo de agregación.

Figura 19 (Ejemplo 13): Resultados de los experimentos de ensayo de desagregación.

Figura 20: (Ejemplo 16): Resultados de los experimentos de neuroprotección con anticuerpo C2 humanizado.

Breve descripción de las secuencias

- 20 SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR1) variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.
- SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR2) variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.
- 25 SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR3) variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.
- SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR1) variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR2) variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- 30 SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de la región (CDR3) variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de la región 2 del epítomo de A β .
- SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de la región 1 del epítomo de A β .
- SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos de la región 2 modificada del epítomo A β .
- 35 SEQ ID NO: 10 Secuencia de aminoácidos de la región 1 modificada del epítomo A β .
- SEQ ID NO: 11 Secuencia de aminoácidos de la región del Epítomo modificada completa.
- SEQ ID NO: 12 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- SEQ ID NO: 13 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera humanizada de C2.
- SEQ ID NO: 14 Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera humanizada de C2.
- 40 SEQ ID NO: 15 Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2
- SEQ ID NO: 16 Secuencia de aminoácidos de cadena pesada humanizada de C2.
- SEQ ID NO: 17 Secuencia de aminoácidos de la REGIÓN C de la CADENA de IgG GAMMA-4modificada .
- SEQ ID NO: 18 Secuencia de nucleótidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.

- SEQ ID NO: 19 Secuencia de nucleótidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.
- SEQ ID NO: 20 Secuencia de nucleótidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- 5 SEQ ID NO: 21 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2.
- SEC ID NO: 22 Secuencia de nucleótidos de cadena ligera humanizada de C2.
- SEQ ID NO: 23 Secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena ligera humanizada de C2.
- SEQ ID NO: 24 Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2.
- SEQ ID NO: 25 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada humanizada de C2.
- 10 SEQ ID NO: 26 Secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena pesada humanizada de C2.
- SEQ ID NO: 27 Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de Cadena Ligera C2 de Ratón.
- SEQ ID NO: 28 Secuencia de aminoácidos de la Región Variable de Cadena Pesada de C2 de Ratón.
- SEQ ID NO: 29 Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de Cadena Ligera de C2 de Ratón.
- SEQ ID NO: 30 Secuencia de nucleótidos de Cadena Ligera de C2 de Ratón.
- 15 SEQ ID NO: 31 Secuencia de nucleótidos de la Región Variable de Cadena Ligera de C2 de Ratón.
- SEQ ID NO: 32 Secuencia de nucleótidos de Cadena Pesada de C2 de Ratón.

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos según la presente invención que incluyen cualquiera de los anticuerpos funcionalmente equivalentes o partes funcionales de los mismos o, más particularmente, un anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se ha descrito en el presente documento puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual de un sujeto, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, como, por ejemplo, la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y a la degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

En particular, una composición, particularmente una composición terapéutica que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, como se describe en el presente documento en una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de la beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

En otra realización, la composición según la invención que se utilizará en el tratamiento de enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de la beta-amiloide; el vítreo que conduce a la amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, se proporciona en forma de una mezcla, en donde el anticuerpo y la otra sustancia biológicamente activa se entremezclan en o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable o el anticuerpo y la otra

sustancia biológicamente activa pueden proporcionarse por separado como parte de una composición independiente, que pueden ofrecerse por separado o juntas a modo de un kit de piezas.

5 El glaucoma es un grupo de enfermedades del nervio óptico que implican la pérdida de células ganglionares de la retina (RGC) en un modelo característico de neuropatía óptica. El glaucoma va a menudo, pero no siempre, acompañado por un aumento de la presión ocular, que puede ser el resultado de una obstrucción de la circulación del humor acuoso, o de su drenaje.

Aunque la presión intraocular elevada es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de glaucoma, no se puede definir un umbral de la presión intraocular que sea determinante para causar glaucoma.

10 El daño puede ser causado también por un deficiente suministro de sangre a las fibras vitales del nervio óptico, una debilidad en la estructura del nervio, y/o un problema en la salud de las propias fibras nerviosas.

El glaucoma sin tratar conduce a un daño permanente del nervio óptico y a una pérdida resultante del campo visual, que puede progresar hasta ceguera.

15 Las RGC son las células nerviosas que transmiten señales visuales desde el ojo hasta el cerebro. La Caspasa-3 y la Caspasa-8, dos enzimas importantes en el proceso de la apoptosis, son activadas en el proceso que conduce a la apoptosis de las RGC. La Caspasa-3 escinde la proteína precursora del amiloide (APP) para producir fragmentos neurotóxicos, que incluyen Amiloide β . Sin el efecto protector de la APP, la acumulación de Amiloide β en la capa de las células ganglionares de la retina da como resultado la muerte de RGC y la pérdida irreversible de la visión.

20 Los diferentes tipos de glaucomas se clasifican como glaucomas de ángulo abierto, si el estado es crónico, o glaucomas de ángulo cerrado, si el glaucoma agudo aparece de forma repentina. El glaucoma afecta normalmente a ambos ojos, pero la enfermedad puede progresar más rápidamente en un ojo que en el otro.

25 El glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), también conocido como glaucoma de ángulo abierto primario (POAG) es el tipo más común de glaucoma. El COAG es causado por la obstrucción microscópica en la malla trabecular, que disminuye el drenaje de la salida del humor acuoso en el canal de Schlemm y eleva la presión intraocular (IOP). El POAG afecta normalmente a ambos ojos y está fuertemente asociado con la edad y los antecedentes familiares positivos. Su frecuencia aumenta en las personas de edad avanzada a medida que el mecanismo de drenaje del ojo puede llegar a obstruirse gradualmente con el envejecimiento. El aumento en la presión intraocular en sujetos afectados por el glaucoma crónico de ángulo abierto no se ve acompañado de ningún síntoma hasta que la pérdida se siente en la zona central de visión.

30 El glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG) o glaucoma de ángulo cerrado es un tipo de glaucoma poco común caracterizado por un aumento repentino de la presión intraocular de $4,66 \cdot 10^3$ Pa a $10,66 \cdot 10^3$ Pa (35 mmHg a 80 mmHg), que conduce a un intenso dolor y a una pérdida irreversible de la visión. El aumento repentino de la presión es causado por el cierre del ángulo de filtrado y la obstrucción de los canales de drenaje. Los individuos con ángulos estrechos tienen un mayor riesgo de un cierre repentino del ángulo. El AACG ocurre normalmente de forma monocular, pero el riesgo existe en ambos ojos. La edad, cataratas y pseudoexfoliación son también factores de riesgo ya que están asociados con el agrandamiento del cristalino y el hacinamiento o estrechamiento del ángulo. Un repentino ataque de glaucoma puede estar asociado con un intenso dolor en los ojos y dolor de cabeza, inflamación ocular, náuseas, vómitos y visión borrosa.

35 El glaucoma de mecanismo mixto o combinado es una mezcla o combinación de glaucoma de ángulo abierto y cerrado. Afecta a los pacientes con ACG agudo cuyo ángulo se abre después de la iridotomía con láser, pero que siguen requiriendo medicamentos para el control de la IOP, así como los pacientes con POAG o glaucoma pseudoexfoliativo que desarrollan gradualmente un estrechamiento del ángulo.

El glaucoma de tensión normal (NTG), también conocido como glaucoma de baja tensión (LTG) se caracteriza por un daño progresivo del nervio óptico y pérdida de la visión periférica similar a los observados en otros tipos de glaucoma; sin embargo, la presión intraocular está en el intervalo normal o incluso inferior al normal.

45 El glaucoma congénito (infantil) es un tipo de glaucoma hereditario de ángulo abierto relativamente poco frecuente. El insuficiente desarrollo de la zona de drenaje da como resultado un aumento de la presión en el ojo que puede conducir a la pérdida de visión por daño al nervio óptico y a un ojo agrandado. El diagnóstico y tratamiento precoz son críticos para preservar la visión en bebés y niños afectados por la enfermedad.

50 El glaucoma secundario puede ser consecuencia de una lesión ocular, inflamación en el iris del ojo (iritis), diabetes, cataratas, o por el uso de esteroides en individuos sensibles a los esteroides. El glaucoma secundario puede estar asociado también con el desprendimiento de retina u oclusión u obstrucción de la vena retiniana.

El glaucoma pigmentario se caracteriza por el desprendimiento de gránulos de pigmento del iris. Los gránulos causan la obstrucción del sistema de drenaje del ojo, lo cual conduce a presión intraocular elevada y a dañar el nervio óptico.

El glaucoma exfoliativo (pseudoexfoliación) se caracteriza por depósitos de material en escamas sobre la cápsula anterior y en el ángulo del ojo. La acumulación del material en escamas bloquea el sistema de drenaje y eleva la presión en el ojo.

5 El diagnóstico del glaucoma puede hacerse utilizando varias pruebas. La tonometría determina la presión en el ojo midiendo el tono o firmeza de su superficie. Para esta prueba se dispone de varios tipos de tonómetros, siendo el más común el tonómetro de aplanación. La paquimetría determina el espesor de la córnea que, a su vez, mide la presión intraocular. La gonioscopia permite el examen del ángulo de filtración y de la zona de drenaje del ojo. La gonioscopia puede determinar también si los vasos sanguíneos anómalos pueden estar obstruyendo el drenaje del humor acuoso fuera del ojo. La oftalmoscopia permite el examen del nervio óptico y puede detectar la caída de la
10 capa de fibras nerviosas o los cambios en el disco óptico, o indentación (ahuecamiento) de esta estructura que puede ser causada por aumento de la presión intraocular o caída axonal. La gonioscopia es también útil en la evaluación de daños en el nervio por el flujo sanguíneo deficiente o el aumento de la presión intraocular. La prueba del Campo Visual mapea el campo de visión, subjetivamente, que puede detectar signos de daño glaucomatoso en el nervio óptico. Esto es representado por patrones específicos de la pérdida del campo visual. La tomografía de
15 coherencia ocular, una medida objetiva de la pérdida de la capa de fibras nerviosas, se lleva a cabo observando el espesor de la capa de fibras del nervio óptico (alterada en el glaucoma) mediante un diferencial de transmisión de la luz a través del tejido axonal dañado.

20 Las drusas del nervio óptico son concreciones globulares de proteínas y sales de calcio que se considera que representan secreciones a través de estructuras vasculares congénitamente alteradas que afectan a la capa de fibras nerviosas axonales. Estas acumulaciones se producen en la capa de fibras nerviosas peripapilares y se considera que dañan la capa de fibras nerviosas, ya sea directamente por compresión o indirectamente por las interrupciones del suministro vascular a la capa de fibras nerviosas. Por lo general, se vuelven visibles después del primer decenio de vida en los individuos afectados. Se presenta con mayor frecuencia en ambos ojos pero también puede afectar a un sólo ojo, y puede causar pérdida leve de la visión periférica durante muchos años.

25 La neuropatía óptica es una enfermedad caracterizada por un daño en el nervio óptico causado por desmielinización, obstrucción del suministro de sangre, deficiencias nutricionales, o toxinas. Las neuropatías ópticas desmielinizantes (véase la neuritis óptica más adelante) son causadas normalmente por un proceso de desmielinización subyacente tal como la esclerosis múltiple. La obstrucción del suministro de sangre, conocida como neuropatía óptica isquémica, puede conducir a muerte o disfunción de las células del nervio óptico. La neuropatía
30 óptica isquémica no arterítica suele aparecer en personas de mediana edad. Los factores de riesgo incluyen la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis. La neuropatía óptica isquémica arterítica suele aparecer en las personas mayores después de inflamación de las arterias (arteritis), particularmente la arteria temporal (arteritis de la temporal). La pérdida de visión puede ser rápida o desarrollarse gradualmente a lo largo de 2 a 7 días y el daño puede ser en uno o en ambos ojos. En las personas con neuropatía óptica causada por la exposición a una toxina o
35 a una deficiencia nutricional, ambos ojos suelen verse afectados.

Aproximadamente el 40 % de las personas con neuropatía óptica isquémica no arterítica experimentan una mejora espontánea a lo largo del tiempo. La neuropatía óptica isquémica no arterítica es tratada controlando los niveles de presión arterial, diabetes y colesterol. La neuropatía óptica isquémica arterítica es tratada con altas dosis de corticosteroides para impedir la pérdida de la visión en el segundo ojo.

40 La neuritis óptica está asociada con la pérdida de visión leve o grave en uno o ambos ojos y puede ser causada por un proceso de desmielinización sistémica (véase más arriba), infección viral, vacunación, meningitis, sífilis, esclerosis múltiple e inflamación intraocular (uveítis). El movimiento de los ojos puede ser doloroso y la visión se puede deteriorar con episodios repetidos. El diagnóstico implica el examen de las reacciones de las pupilas y determinar si el disco óptico está hinchado. La formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) puede
45 mostrar evidencias de esclerosis múltiple o, en raras ocasiones, un tumor presionando el nervio óptico, en cuyo caso la visión mejora una vez que se alivia la presión del tumor. La mayoría de los casos de neuritis óptica mejoran en unos pocos meses sin tratamiento. En algunos casos, puede ser necesario el tratamiento con corticosteroides por vía intravenosa.

50 Una catarata es una opacidad que se desarrolla en el cristalino del ojo o en su envoltura. Normalmente, las cataratas causan una progresiva pérdida de visión y pueden causar ceguera si no se tratan. En la Catarata de Morgagni, la corteza de la catarata se licúa progresivamente para formar un fluido blanco lechoso y puede causar grave inflamación si se rompe la cápsula del cristalino y hay una fuga. Si se deja sin tratar, la catarata puede también causar glaucoma facomórfico. Las cataratas pueden ser de naturaleza congénita o causadas por factores genéticos, edad avanzada, exposición a ultravioleta de larga duración, exposición a radiación, diabetes, lesión ocular o trauma
55 físico.

La cirugía extra-capsular (ECCE) es el tratamiento más eficaz para tratar las cataratas. En la cirugía, el cristalino se extrae, pero la mayor parte de la cápsula del cristalino se deja intacta. La facoemulsificación, una pequeña incisión en el lado de la córnea, se utiliza típicamente para separar el cristalino antes de la extracción.

La amiloidosis ocular es un trastorno hereditario asociado con el tipo I de la Polineuropatía Amiloidótica Familiar

(FAP) y caracterizado por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías pupilares y, en algunos casos, opacidades vítreas y glaucoma secundario. La FAP de Tipo I se asocia con mutaciones en la transtiretina (TTR), una proteína (prealbúmina) tetrámera del plasma sintetizada en el hígado, el epitelio 2 pigmentario retiniano y el plexo coroideo del cerebro. Las diferentes mutaciones causan que la transtiretina polimerice en una estructura plegada de fibrilla de amiloide, que conduce a amiloidosis hereditaria. La mutación más frecuente es TTR-met303, en la que la metionina reemplaza la valina en la posición 30 por la transtiretina.

La FAP de Tipo IV está asociada con la distrofia corneal reticular (LCD). La distrofia corneal reticular es una amiloidosis corneal normalmente bilateral, primaria, hereditaria caracterizada por la presencia de líneas reticulares refráctiles con un doble contorno en el estroma corneal. La LCD de tipo I (Biber-Haab-Dimmer) es un trastorno autosómico dominante corneal bilateralmente simétrico caracterizado por la presencia de numerosas líneas reticulares finas translúcidas con puntos blancos y una tenue bruma en las capas superficiales e intermedias del estroma central. Los síntomas comienzan durante el primero o segundo decenio de vida, causando una pérdida progresiva de la visión. La mayoría de los pacientes requieren un trasplante corneal a los 40 años de edad. La LCD de tipo II está asociada con la amiloidosis sistémica (síndrome de Meretoja) y se caracteriza por la presencia de líneas reticulares gruesas en el limbo, en la córnea central y en el estroma. La visión no se ve afectada hasta más tarde a lo largo de la vida. La LCD de tipo III afecta a personas de mediana edad y se caracteriza por la presencia de líneas gruesas reticulares que se extienden de limbo a limbo. La LCD de tipo III A se caracteriza por la acumulación de depósitos de amiloide en el estroma y la presencia de cintas de amiloide entre el estroma y la capa de Bowman, la LCD de tipo III A se diferencia de la LCD de tipo III debido a la presencia de erosiones corneales, la aparición de blancos y el modelo de herencia autosómica dominante.

El síndrome de Down (SD) o trisomía 21 es el trastorno genético más frecuente, con una incidencia de aproximadamente 1:700 de los nacidos vivos, y se asocia a menudo con varias anomalías congénitas. El trastorno, que es causado por la presencia de un cromosoma 21 extra, se asocia con depósitos prematuros del beta-amiloide de la proteína formadora de la placa y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en la mediana edad. Además, muchas personas afectadas por el DS se ven afectadas por cataratas que empiezan en la infancia y muchos padecen glaucoma congénito. Dado que el gen de la proteína precursora del amiloide, que se escinde para formar la amiloide beta, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21 en humanos, la sobreexpresión de este gen puede conducir a un aumento de los niveles de la proteína precursora del amiloide y a la deposición del amiloide en el síndrome de Down.

No hay cura para el glaucoma. Los medicamentos para el tratamiento del glaucoma incluyen agentes que disminuyen la producción de humor acuoso en el ojo, tal como los betabloqueantes (Timoptic, Betoptic), inhibidores de la anhidrasa carbónica (Trusopt, Azopt), y agonistas alfa (Alphagan, lopicine), y agentes que redirigen el drenaje del humor acuoso a través de un camino diferente en la parte posterior del ojo, tal como la prostaglandina (Xalatan). Las cirugías con láser incluyen trabeculoplastia, un procedimiento que ayuda a que el humor acuoso salga del ojo de manera más eficiente. Según la Glaucoma Foundation, casi el 80 % de los pacientes responden bastante bien al procedimiento para retrasar o evitar una cirugía adicional. Sin embargo, la presión aumenta de nuevo en los ojos de la mitad de todos los pacientes a los dos años después de la cirugía con láser, según el National Eye Institute. La cirugía de incisión se realiza si los medicamentos y los tratamientos iniciales con láser no tienen éxito en la reducción de la presión en el ojo. Un tipo de cirugía, la trabeculectomía, crea una abertura en la pared del ojo de manera que el humor acuoso pueda drenar. Sin embargo, aproximadamente un tercio de los pacientes con trabeculectomía desarrollan cataratas en el plazo de cinco años, según la Glaucoma Foundation. Si la trabeculectomía fracasa, los procedimientos incisionales adicionales incluyen la colocación de un tubo de drenaje en el ojo entre la córnea y el iris y el uso de un láser o un tratamiento de congelación para destruir el tejido del ojo que produce el humor acuoso. La cirugía puede salvar la visión que queda en el paciente, pero no mejora la vista. La visión puede ser, en realidad, peor después de la cirugía.

La degeneración macular asociada a la edad (AMD) es una de las principales causas de ceguera entre los caucásicos mayores de 65 años. Aunque se ha progresado mucho recientemente en la investigación de la degeneración macular, no existen tratamientos que rescaten de la muerte a las células neuronales aparecen en el transcurso de la enfermedad. No existen tampoco tratamientos definitivos para otras enfermedades oculares asociados con la degradación neuronal relacionada con la amiloide beta, tal como deficiencias visuales corticales, drusas en el nervio óptico, neuropatía óptica, neuritis óptica, amiloidosis ocular y distrofia reticular.

En consecuencia, existe la urgente necesidad en la técnica de mejores opciones de tratamiento para los sujetos afectados por enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular. La presente invención satisface esta necesidad, proporcionando soluciones que se dirigen al proceso que causa una enfermedad ocular asociada con la degradación neuronal relacionada con la amiloide beta

en un sujeto afectado por la enfermedad.

Además de este objetivo, la invención se refiere al uso de un anticuerpo según la invención y como se describe en el presente documento, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo y/o de una composición farmacéutica según la invención y como se describe en el presente documento, o de una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento que utiliza un anticuerpo según la invención y como se describe en el presente documento, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo para uso el tratamiento o alivio de los efectos de las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

En otra realización, la invención proporciona un medicamento que comprende un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, una composición farmacéutica o una mezcla que comprende el anticuerpo según la invención y como se describe en el presente documento en una cantidad terapéuticamente eficaz, para prevenir, tratar o aliviar los efectos de las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para reducir la carga de placa en la capa de células ganglionares de la retina de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, que comprenden administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite un tratamiento de este tipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento. Las anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750. En particular, la carga de la placa se reduce en al menos un 20 %, particularmente en al menos un 25 %, más particularmente en al menos un 30 %, incluso más particularmente en más de un 30 %.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de placas en la capa de células ganglionares de la retina del sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual,

particularmente asociada con la anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tal como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite un tratamiento de este tipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con número de acceso DSM ACC2750. En particular, la cantidad de placas en el cerebro se reduce en al menos un 10 %, particularmente en al menos un 15 %, más particularmente en más de un 15 %.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para disminuir la cantidad total de A β soluble en la capa de células ganglionares de la retina de un sujeto, particularmente un mamífero, pero especialmente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, que comprende administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite un tratamiento de este tipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para prevenir, tratar o aliviar los efectos de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, en un animal, mamífero, o un ser humano afectado por la enfermedad ocular asociada con la degradación neuronal relacionada con la beta-amiloide, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento, a un sujeto, particularmente a un mamífero, más particularmente a un ser humano que necesite un tratamiento de este tipo. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en un sujeto que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente

o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento, a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de: (a) poner la muestra, o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con un anticuerpo según la invención, cuyo anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide; y (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o en la parte o área del cuerpo específica. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento para diagnosticar una predisposición a una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en un sujeto que comprende detectar la unión específica de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento, con un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de: (a) poner la muestra, o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con el anticuerpo, en donde el anticuerpo se une a un epítipo conformacional de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a cualquier proteína amiloide en la muestra para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o en la parte o área del cuerpo específica, y (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal, en donde un aumento en la cantidad del complejo en comparación con un valor de control normal indique que el sujeto padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la supervisión de enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en un sujeto después del tratamiento con una composición farmacéutica según la invención, en donde el procedimiento comprende: (a) poner una muestra, o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o en la parte del cuerpo o área del cuerpo específica; y (e) comparar la cantidad del complejo inmunológico con un valor normal de control, en donde un aumento de la cantidad del complejo en comparación con un valor normal de control indica que el sujeto todavía padece una enfermedad ocular residual mínima asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para predecir la respuesta de un sujeto que está siendo tratado con una composición farmacéutica según la invención que comprende las etapas de: (a) poner una muestra, o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento, cuyo anticuerpo se une a un epítipo de la

proteína amiloide; (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico; (c) detectar la formación del complejo inmunológico; (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica, y (e) comparar la cantidad de complejo inmunológico antes y después del comienzo del tratamiento, en donde una
 5 disminución en la cantidad de complejo inmunológico indica que el sujeto tiene un alto potencial de ser sensible al tratamiento. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de
 10 ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para mantener o disminuir la presión ocular en los ojos de un sujeto, concretamente un mamífero, más concretamente un ser humano que padece una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con
 15 anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, en donde dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el
 20 vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, que comprende
 administrar al sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano que necesite un tratamiento de este tipo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal humanizado que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, o una
 25 composición o una mezcla según la invención y como se describe en el presente documento. En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en los procedimientos de este tipo es el C2 humanizado o una parte funcional del mismo como se describe en el presente documento. En particular, el anticuerpo monoclonal humanizado se produce a partir del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 de ratón, depositado el 1 de diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, con el número de acceso DSM ACC2750.

30 **Definiciones**

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", como se usan en el presente documento, son intercambiables y se definen para indicar una biomolécula compuesta de aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

Los términos "un", "una" y "el" como se usan en el presente documento se definen para indicar "uno o más" e incluyen el plural salvo que el contexto sea inapropiado.

35 El lenguaje "enfermedades y trastornos que son causadas por o están asociadas a proteínas amiloides o de tipo amiloide" incluye, pero no se limita a, las enfermedades y los trastornos causados por la presencia o actividad de las proteínas de tipo amiloide en el estado de monómero, fibrilar o de polímero o cualquier combinación de los tres. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, amiloidosis, tumores endocrinos y otras
 40 enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración
 45 retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

La frase "enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal, se refiere a anomalías patológicas asociadas con una función o
 50 deposición de β -amiloide aberrante que da como resultado la degradación neuronal, que puede aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración
 55 retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

El término "amiloidosis" se refiere a un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye, pero no se limita a, la amiloidosis secundaria y la amiloidosis relacionada con la edad tal como
 60 las enfermedades que incluyen, pero que no se limitan a, los trastornos neurológicos como la Enfermedad de

Alzheimer (AD), que incluyen enfermedades o estados caracterizados por una pérdida de la capacidad de memoria cognitiva, tal como, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas de tipo amiloide tal como la parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), miositis por cuerpos de inclusión (IBM), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardiaca senil, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios asociadas con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

Los términos "detectar" o "detectado" como se usan en el presente documento significan utilizar técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tal como los procedimientos inmunoquímico o histológico, y se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o concentración de la biomolécula que se está investigando.

"Amiloide soluble polimérico" se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos amiloides, o de péptidos de tipo amiloide, o de péptidos amiloides modificados o truncados o de otros derivados de péptidos amiloides que forman estructuras de oligómeros o polímeros que son solubles en el cuerpo de un mamífero o ser humano, más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros de amiloide β ($A\beta$) agregados o de péptidos amiloides β ($A\beta$) modificados o truncados o de derivados de los mismos, que son solubles en el cuerpo del mamífero o ser humano, más particularmente en el cerebro.

"Amiloide β , $A\beta$ o β -amiloide" es un término reconocido en la técnica y se refiere a proteínas y péptidos amiloides β , proteína precursora de amiloide β (APP), así como modificaciones, fragmentos y cualquier de sus equivalentes funcionales. En particular, por amiloide β como se utiliza en el presente documento se entiende cualquier fragmento producido mediante la escisión proteolítica de APP pero especialmente aquellos fragmentos que están involucrados en o están asociados con las patologías amiloideas que incluyen, pero no se limitan a, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$, y $A\beta_{1-43}$.

La estructura y secuencias de los péptidos de amiloide β mencionados anteriormente son bien conocidas por los expertos en la técnica y los procedimientos de producir dichos péptidos o de extraerlos del cerebro y de otros tejidos se describen, por ejemplo, en Glenner y Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Además, los péptidos de amiloide β están también comercialmente disponibles en diversas formas.

Por "aislado" se entiende una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los que aparece de forma natural.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en el presente documento son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refiere a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une específicamente a un antígeno. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la inmunoglobulina kappa y lambda, los genes de región constante alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como una miríada de genes de región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como kappa o como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. También se conocen subclases de cadena pesada. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgG en los seres humanos pueden ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la frase "se une específicamente" en referencia a un anticuerpo significa que el anticuerpo se une a su antígeno diana con mayor afinidad de lo que lo hace con un antígeno o antígenos estructuralmente diferentes.

Se sabe que una típica unidad estructural de inmunoglobulina comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El N-término de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a esas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de longitud completa o como una serie de fragmentos bien

caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas o productos químicos. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-CH_1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra transformando de ese modo el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región bisagra (véase, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Mientras que varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto comprenderá que cualquiera de los diversos fragmentos de anticuerpos pueden ser sintetizados *de novo* bien químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. De ese modo, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento incluye también fragmentos de anticuerpo bien producidos por la modificación de anticuerpos enteros o sintetizados *de novo* o anticuerpos y fragmentos obtenidos utilizando metodologías de ADN recombinante.

Se pretende que "anticuerpos", dentro del alcance de la presente invención, incluya anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena sencilla, biespecificos, simianizados, humanos y anticuerpos humanizados, así como fragmentos activos de los mismos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen cadenas ligera y pesada separadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab' y $F(ab')_2$, que incluyen los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos que unen el epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos se pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención mediante una serie de técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden escindirse con una enzima, tal como pepsina, y someterse a filtración en gel HPLC. La fracción apropiada que contiene fragmentos Fab pueden después recolectarse y concentrarse por filtración con membrana y similares. Para una descripción adicional de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase, por ejemplo, Khaw, B. A. et al. *J. Nucl. Med.* 23:1011-1019 (1982); Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Los anticuerpos elaborados de manera recombinante pueden ser anticuerpos convencionales de longitud completa, fragmentos de anticuerpos activos conocidos de la digestión proteolítica, fragmentos de anticuerpos activos únicos, tales como Fv o Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio eliminado, y similares. Un anticuerpo Fv tiene un tamaño de aproximadamente 50 kDa y comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada. Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero $VH::VL$ unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH y VL ya sea unidas directamente o unidas por un enlazador que codifica el péptido. Véase Huston, et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 85:5879-5883. Una serie de estructuras para transformar las cadenas polipeptídicas ligera y pesada agregadas de forma natural, pero separadas químicamente, de una región V de anticuerpo a una molécula scFv la cual se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778.

El sitio de combinación refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por restos aminoácidos de las regiones variables ("V") del N-término de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Las regiones variables del anticuerpo comprenden tres tramos muy divergentes referidos como "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) que están interpuestas entre los tramos flanqueadores más conservados conocidos como "regiones marco" (FR). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) están dispuestas unas respecto a otras en un espacio tridimensional para formar una superficie o bolsillo de unión al antígeno. El sitio de combinación del anticuerpo representa, por lo tanto, los aminoácidos que componen las CDR de un anticuerpo y cualquiera de los restos marco que componen el bolsillo del sitio de unión.

La identidad de los restos de aminoácidos en un anticuerpo particular que componen el sitio de combinación puede determinarse utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las CDR del anticuerpo se pueden identificar como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat et al. (véanse, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G. y Wu, T.T. (2001) *Kabat Database and its applications: future directions*. *Nucleic Acids Research*, 29:205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Las posiciones de las CDR pueden también identificarse como las estructuras de bucle estructurales originalmente descritos por Chothia y otros, (véase Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987), Chothia et al., *Nature* 342, 877 (1989), y Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215, 175 (1990)). Otros procedimientos incluyen la "definición AbM" que es un compromiso entre Kabat y Chothia y se obtiene utilizando un software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (ahora Accelrys) o la "definición de contacto" de las CDR por Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography" *J Mol Biol.*, 11 octubre de 1996; 262(5):732-45). El siguiente cuadro identifica las CDR basadas en varias definiciones conocidas.

ES 2 609 918 T3

	Bucle	Kabat	AbM	Chlotia	Contacto
	L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
	L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
5	L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
	H1	H31--H35B	H26--H35B	H26--H32..34	H30--
	H35B (Numeración de Kabat)				
	H1 (Numeración de Chothia)	H31--H35	H26--H35B	H26--H32	H30--H35
10	H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
	H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--
	H101				

15 Las pautas generales por las que se pueden Identificar las CDR en un anticuerpo a partir de una sola secuencia son las siguientes:

LCDR1:

Inicio - Aproximadamente en el resto 24.

El resto anterior es siempre Cys.

20 El resto posterior es siempre Trp. Típicamente, TRP va seguida por TYR-GLN, pero también puede ser seguida por LEU-GLN, PHE-GLN o TYR-LEU.

La longitud es de 10 a 17 restos.

LCDR2:

Inicio -16 restos después del final de L1.

La secuencia anterior es generalmente ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS, o ILE-PHE.

25 La longitud es, generalmente, de 7 restos.

LCDR3:

Inicio - generalmente 33 restos después del final de L2.

El resto anterior es Cys.

La secuencia posterior es PHE-GLY-X-GLY.

30 La longitud es de 7 a 11 restos.

HCDR1:

Inicio - en aproximadamente el resto 26 (cuatro restos después de CYS) [Chothia/definición AbM] La definición de Kabat empieza 5 restos más tarde.

La secuencia anterior es CYS-X-X-X.

35 El resto posterior es un TRP, típicamente seguido por VAL, pero también seguido por ILE, o ALA.

La longitud es de 10 a 12 restos bajo la definición de AbM mientras la definición Chothia excluye los últimos 4 restos.

HCDR2:

Inicio - 15 restos después del final de Kabat/definición AbM de CDR-H1.

40 La secuencia anterior es, típicamente, LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO. 1), pero son posibles una serie de variaciones.

La secuencia posterior es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

La longitud es de 16 a 19 restos bajo la definición de Kabat (la definición AbM termina 7 restos antes).

HCDR3:

Inicio -33 restos después del final de CDR-H2 (dos restos después de CYS).

La secuencia anterior es CYS-X-X (típicamente CYS-ALA-ARG).

La secuencia posterior es TRP-GLY-X-GLY.

La longitud es de 3 a 25 restos.

5 La identidad de los restos aminoácidos en un anticuerpo particular que están fuera de las CDR, pero que ninguno de ellos forma parte del sitio de combinación por tener una cadena lateral que es parte de la cobertura del sitio de combinación (es decir, está disponible para su vinculación a través del sitio de combinación), se puede determinar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como el modelado molecular y la cristalografía de rayos X. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., (1988) *Nature*, 332: 323-327.

10 Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que una o más regiones del anticuerpo son de una especie animal y una o más regiones del anticuerpo son de una especie animal diferente. Un anticuerpo quimérico preferido es uno que incluye regiones de una inmunoglobulina de primate. Un anticuerpo quimérico para uso clínico en humanos se entiende que normalmente tiene regiones variables de un animal no humano, por ejemplo un roedor, con las regiones constantes de un ser humano. Por el contrario, un anticuerpo humanizado utiliza CDR de anticuerpo no humano con la mayoría o todas las regiones marco variables y todas las regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Un anticuerpo quimérico humano se entiende que normalmente tiene las regiones variables de un roedor. Un típico anticuerpo quimérico humano tiene regiones constantes pesadas humanas y regiones constantes de cadena ligera humanas con las regiones variables tanto pesada como ligera procedentes de un anticuerpo de roedor. Un anticuerpo quimérico puede incluir algunos cambios en una secuencia de aminoácidos nativa de las regiones constantes humanas y la secuencia nativa de la región variable de roedor. Los anticuerpos quiméricos y humanizados pueden prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica, que incluyen los enfoques de trasplante de CDR (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.843.708; 6.180.370; 5.693.762; 5.585.089; y 5.530.101), las estrategias de intercambio de cadenas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.565.332; Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1998) 95:8910-8915), las estrategias de modelado molecular (patente de EE.UU. n.º 5.639.641), y similares.

25 Un "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento en el caso de un anticuerpo de doble cadena es uno donde al menos una cadena es humanizada. Una cadena de anticuerpo humanizado tiene una región variable donde una o más de las regiones marco son humanas. Un anticuerpo humanizado que es una sola cadena es uno donde la cadena tiene una región variable donde una o más de las regiones marco son humanas. Las porciones no humanas de la región variable de la cadena de anticuerpo humanizado o fragmento del mismo se deriva de un origen no humano, particularmente un anticuerpo no humano, normalmente de origen roedor. La contribución no humana al anticuerpo humanizado se proporciona típicamente en forma de al menos una región CDR que se intercala entre las regiones marco derivadas de una (o más) inmunoglobulina o inmunoglobulinas humanas. Además, los restos de apoyo del marco pueden ser alterados para preservar la afinidad de unión.

35 El anticuerpo humanizado puede comprender además regiones constantes (*p. ej.*, al menos una región constante o parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). Las regiones constantes de un anticuerpo humanizado, si están presentes, son generalmente humanas.

40 Los procedimientos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, *p. ej.*, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" se puede obtener también mediante un nuevo enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano de afinidad madurada en animales grandes como, por ejemplo, conejos y ratones. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.632.976.

45 La frase "región constante" (CR) tal como se utiliza en el presente documento se refiere a genes de las regiones constantes de la inmunoglobulina. Los genes de las regiones constantes codifican la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. Para los anticuerpos humanos Quiméricos y los anticuerpos humanizados, normalmente no humanos (*p. ej.*, murinos), las regiones constantes son sustituidas por regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados de sujetos se derivan normalmente de inmunoglobulinas humanas. La región constante de cadena pesada se puede seleccionar de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Además, las cadenas pesadas de varias subclases (tales como las subclases de IgG de cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras y, por ello, eligiendo la región constante de cadena pesada deseada, pueden producirse los anticuerpos con la función efectora deseada. Las regiones constantes que pueden ser utilizadas dentro del alcance de esta invención son gamma 1 (IgG1), particularmente una región Fc del isotipo gamma 1 (IgG1), gamma 3 (IgG3) y, especialmente, gamma 4 (IgG4). La región constante de cadena ligera puede ser del tipo kappa o lambda, preferiblemente del tipo kappa. En una realización, la región constante de cadena ligera es la cadena constante kappa humana (Heiter et al., (1980) *Cell* 22: 197-207) y la cadena constante pesada es la cadena constante IgG4 humana.

La frase "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La "región Fc" puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana se define normalmente para extenderse desde un resto aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el carboxilo-terminal del mismo. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, CH2 y CH3.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de la secuencia nativa. Las "funciones efectoras" de ejemplo incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (*p. ej.*, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren, generalmente, la región Fc para combinarse con un dominio de unión (*p. ej.*, un dominio variable del anticuerpo) y pueden evaluarse utilizando varios ensayos como se describe en el presente documento, por ejemplo. Una región Fc funcional incluye generalmente dos polipéptidos que contienen CH2 y CH3 de cadena pesada que están en asociación.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácido idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza y variantes de la misma que aparecen de forma natural.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una "modificación de aminoácidos" como se define en el presente documento. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, *p. ej.*, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento poseerá, preferiblemente, al menos aproximadamente un 80 % de homología con una región Fc de la secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de homología con los mismos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95 % de homología con los mismos.

Una "modificación de aminoácido" se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos predeterminada. Las modificaciones de ejemplo incluyen una sustitución, inserción y/o supresión de aminoácido. La modificación de aminoácido preferida en el presente documento es una sustitución.

Una "modificación de aminoácidos en" una posición especificada, *p. ej.* de la región Fc, se refiere a la sustitución o supresión del resto especificado, o la inserción de al menos un resto aminoácido adyacente al resto especificado. Por inserción "adyacente" un resto especificado está destinado a inserción dentro de uno a dos de sus restos. La inserción puede ser N-terminal o C-terminal al resto especificado.

Una "sustitución de aminoácido" se refiere a la sustitución de al menos un resto aminoácido existente en una secuencia de aminoácidos predeterminada con otro resto aminoácido "de sustitución" diferente. El resto o restos de sustitución pueden ser "restos aminoácidos que aparecen de forma natural" (es decir codificados por el código genético) y seleccionados del grupo que consiste en: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); Isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). Preferiblemente, el resto de sustitución no es cisteína. La sustitución con uno o más restos de aminoácidos de origen no natural está también abarcada por la definición de una sustitución de aminoácido en el presente documento.

Un "resto de aminoácido de origen no natural" se refiere a un resto, distinto de los restos aminoácidos de origen natural listados anteriormente, que es capaz de unirse covalentemente a resto o restos de aminoácidos adyacentes en una cadena de polipéptidos. Ejemplos de restos de aminoácidos de origen no natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de restos aminoácidos tales como los descritos en Ellman et al. *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991). Para generar tales restos aminoácidos de origen no natural, se pueden utilizar los procedimientos de Noren et al. *Science* 244:182 (1989) y Ellman et al., *supra*. En resumen, estos procedimientos involucran activar químicamente un ARNt supresor con un resto aminoácido de origen no natural seguido de la transcripción y traducción *in vitro* del ARN.

Las "inserciones de aminoácido" se refieren a la incorporación de al menos un aminoácido en una secuencia de aminoácidos predeterminada. Mientras que la inserción consistirá, normalmente, en la inserción de uno o dos restos de aminoácidos, la presente solicitud contempla más grandes "inserciones de péptidos," *p. ej.*, inserción de aproximadamente tres a aproximadamente cinco o incluso hasta aproximadamente diez restos de aminoácidos. El resto o restos insertados pueden ser de origen natural o de origen no natural como se describió anteriormente.

Una "supresión de aminoácidos" se refiere a la eliminación de al menos un resto aminoácido de una secuencia de aminoácidos predeterminada.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en

la que el anticuerpo secretado unido al antígeno diana expresado por células diana es reconocido por receptores Fc (FcR) presentes en algunas células citotóxicas (p. ej., células aniquilantes naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) que permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente para reconocer la célula diana revestida de anticuerpo y posteriormente destruir la célula diana con citotoxinas. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc.gamma.RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc.gamma.RI, Fc.gamma.RII y Fc.gamma.RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células aniquilantes naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, p. ej., en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (EE.UU.) 95:652-656 (1998).

"Células efectoras inmunes" son leucocitos que expresan una o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc.gamma.RIII y realizan una función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células aniquilantes naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo las células PBMC y NK preferidas. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, p. ej., de la sangre o de las PBMC como se describe en el presente documento.

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis dependiente del complemento de una célula diana que se ha unido mediante anticuerpo reactivo con antígeno expresado por la célula diana. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, p. ej., como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

Un polipéptido con una Fc de IgG variante con afinidad de unión FcR o actividad ADCC "alterada" es el que tiene una actividad de unión a FcR (Fc.gamma.R o FcRn) ya sea potenciada o reducida y/o la actividad de ADCC comparada con un polipéptido original o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La Fc variante que "presenta un aumento de la unión" a un FcR une al menos un FcR con mejor afinidad que el polipéptido original. La mejora en la unión en comparación con un polipéptido original puede ser de aproximadamente 3 veces, preferiblemente de aproximadamente 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, hasta 500 veces, o de aproximadamente 25 % a 1.000 % de mejora en la unión. La variante de polipéptido que "presenta disminución de la unión" a un FcR, une al menos un FcR con peor afinidad que un polipéptido original. La disminución en la unión en comparación con un polipéptido original puede ser de aproximadamente 40 % o más de disminución en la unión. Tales variantes Fc que presentan una disminución de la unión a un FcR pueden poseer poca o ninguna unión apreciable a un FcR, p. ej., 0-20 % de unión a FcR en comparación con una región Fc de IgG de secuencia nativa, p. ej., como se determina en los Ejemplos en el presente documento.

El polipéptido que comprende una región Fc variante que "presenta una mayor ADCC" o que media la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficazmente que un polipéptido que tiene Fc de IgG de tipo salvaje es el que *in vitro* o *in vivo* es substancialmente más eficaz para mediar ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con la región Fc variante y el polipéptido con región Fc de tipo salvaje utilizados en el ensayo son esencialmente el mismo (siendo los demás factores iguales). En general, tales variantes se identificarán utilizando un ensayo de ADCC *in vitro*, pero se contemplan otros ensayos o procedimientos para determinar la actividad de ADCC, p. ej., en un modelo animal, etc. La variante preferida es desde aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 100 veces, p. ej. de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 veces, más eficaz en mediar la ADCC que la Fc de tipo salvaje.

El término "anticuerpo monoclonal" es también muy conocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que es el producto de una única célula productora de anticuerpo clonada. Los anticuerpos monoclonales se producen, típicamente, fusionando célula B que produce anticuerpo normalmente de corta vida a una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerígena (a veces denominada célula "inmortal"). La célula híbrida resultante o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce el anticuerpo.

Para el fin de la presente invención, debe entenderse también que "anticuerpo monoclonal" comprende anticuerpos que son producidos por un clon madre que no ha alcanzado la monoclonalidad completa.

Se entiende que "anticuerpo funcionalmente equivalente" dentro del alcance de la presente invención se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional importante con un anticuerpo mencionado anteriormente y descrito en el presente documento que comprende: especificidad de unión a la proteína β -amiloides, particularmente a la proteína $A\beta_{1-42}$, y más particularmente a la región del epítipo 16-21 de la proteína $A\beta_{1-42}$, la inmunorreactividad *in vitro*, inhibición de la agregación de los monómeros $A\beta_{1-42}$ en fibrillas polímeras de alto peso molecular y/o desagregación de las fibrillas polímeras de $A\beta_{1-42}$ preformadas, y/o una propiedad de rotura de láminas β y aliviar los efectos de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis debida a la edad como enfermedades

que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia con cuerpos de Lewy (LBD), el síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o que están asociadas con proteínas de tipo amiloide tal como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, que incluyen enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloide; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular, cuando se administra profilácticamente o terapéuticamente. Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase tal como IgG, IgM o IgA, etc., o cualquier subclase tal como IgG1, IgG2a, etc., y otras subclases mencionadas en el presente documento anteriormente o conocidas en la técnica, pero particularmente de la clase IgG4. Además, los anticuerpos pueden ser producidos por cualquier procedimiento, tal como la fagovisualización, o producidos en cualquier organismo o línea celular, que incluye bacterias, insectos, mamíferos u otro tipo de célula o línea celular que produce anticuerpos con las características deseadas, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se pueden también formar por combinación de una porción Fab y una región Fc de diferentes especies.

El término "hibridar" tal como se utiliza se refiere a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa como solución 5 x SSPE, SDS al 1 %, 1 x Denhardtts y/o las temperaturas de hibridación están entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente 65 °C. Después de la hibridación, el lavado se lleva a cabo, preferiblemente, primero con 2 x SSC, SDS al 1 % y posteriormente con 0,2 x SSC a temperaturas entre 35 °C y 70 °C, preferiblemente a 65 °C (en relación con la definición de las soluciones SSPE, SSC y Denhardt véase Sambrook et al. *loc. cit.*). Particularmente, se prefieren las condiciones de hibridación rigurosas como, por ejemplo, las descritas en Sambrook et al., *supra*. Condiciones de hibridación rigurosas, particularmente preferidas, están presentes, por ejemplo, si la hibridación y el lavado se producen a 65 °C como se ha indicado anteriormente. Las condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con la hibridación y el lavado llevados a cabo a 45 °C son menos preferidas y a 35 °C, incluso menos.

La "homología" entre dos secuencias se determina por la identidad de secuencia. Si dos secuencias que van a ser comparadas entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia se refiere, preferiblemente, al porcentaje de restos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los restos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia se puede determinar convencionalmente con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, para encontrar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencia entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, una identidad del 95 % con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan, preferiblemente, de modo que la porcentaje de identidad se calcule en toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan huecos de homología de hasta 5 % del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan preferiblemente en sus valores preestablecidos ("por defecto"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias anteriormente descritas de la invención pueden ser causadas, por ejemplo, por adición, supresión, sustitución, inserción o recombinación. Una secuencia de comparación de este tipo se puede también llevar a cabo, preferiblemente, con el programa "fasta2Ou66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W. R. Pearson (1990) *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Con esta finalidad, se pueden usar los ajustes de los parámetros "por defecto".

Se entiende que el anticuerpo según la invención puede ser una inmunoglobulina o anticuerpo, que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos (si multivalente) o, en la alternativa, puede ser un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico".

Un "anticuerpo bifuncional" o "biespecífico" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por diversos procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, *p. ej.*, Songvilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos aminoácidos que un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden obtenerse por tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacto o completo. Los fragmentos pueden también obtenerse por medios recombinantes. Fragmentos a modo de ejemplo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fabc y/o Fv. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de

polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compete con un anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se derivan) para la unión al antígeno (es decir, unión específica).

5 Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cadenas sencillas, y anticuerpos de cadena sencilla.

10 El término "fragmento" se refiere también a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos aminoácidos contiguos, al menos 10 restos aminoácidos contiguos, al menos 15 restos aminoácidos contiguos, al menos 20 restos aminoácidos contiguos, al menos 25 restos aminoácidos contiguos, al menos 40 restos aminoácidos contiguos, al menos 50 restos aminoácidos contiguos, al menos 60 restos aminoácidos contiguos, al menos 70 restos aminoácidos contiguos, al menos 80 restos aminoácidos contiguos, al menos 90 restos aminoácidos contiguos, al menos 100 restos aminoácidos contiguos, al menos 125 restos aminoácidos contiguos, al menos 150 restos aminoácidos contiguos, al menos 175 restos aminoácidos contiguos, al menos 200 restos aminoácidos contiguos, o al menos 250 restos aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización específica, un fragmento de un polipéptido retiene al menos una
15 función del polipéptido.

20 El término "antígeno" se refiere a una entidad o un fragmento de la misma que puede unirse a un anticuerpo. Un inmunógeno se refiere a un antígeno que puede provocar una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero que incluye un ser humano. El término antígeno incluye regiones conocidas como determinantes antigénicos o epítopos que se refieren a una porción del antígeno (las que se ponen en contacto o las que desempeñan un papel importante para apoyar un contacto residen en el antígeno responsable de la antigenicidad o en determinantes antigénicos).

Como se usa en el presente documento, el término "soluble" significa parcial o completamente disuelto en una solución acuosa.

25 También como se utiliza en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a sustancias que provocan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un antígeno del inmunógeno.

Una respuesta inmune aparece cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas contra las composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar la enfermedad a tratar.

30 El término inmunogenicidad tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una medida de la capacidad de un antígeno para provocar una respuesta inmune (humoral o celular) cuando se administra a un receptor. La presente invención se refiere a enfoques que reducen la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos humanos o humanizados del sujeto.

Anticuerpo humanizado de reducida inmunogenicidad se refiere a un anticuerpo humanizado que presenta una reducida inmunogenicidad en relación con el anticuerpo original, por ejemplo, el anticuerpo murino.

35 Anticuerpo humanizado que retiene sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo original se refiere a un anticuerpo humanizado que retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno reconocido por el anticuerpo original para producir tal anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado presentará la misma o sustancialmente la misma afinidad y avidez de unión al antígeno que el anticuerpo original. Idealmente, la afinidad del anticuerpo no será menor que 10 % de la afinidad de anticuerpo original, más preferiblemente no menor que aproximadamente un 30 %, y lo más preferiblemente la afinidad no será menor que un 50 % del anticuerpo original. Los procedimientos para medir la afinidad de unión al antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de unión máxima mitad, ensayos de competición, y el análisis de Scatchard. En esta solicitud se describen ensayos adecuados de unión a antígeno.
40

45 Una "retromutación" es una mutación introducida en una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo humanizado, la mutación da como resultado un aminoácido correspondiente a un aminoácido en el anticuerpo original (p. ej., anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino). Ciertos restos marco del anticuerpo original pueden ser retenidos durante la humanización de los anticuerpos de la invención para retener sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo original, mientras que al mismo tiempo se minimiza la potencial inmunogenicidad del anticuerpo resultante. En una realización de la invención, el anticuerpo original es de ratón. Por ejemplo, la retromutación cambia un resto marco humano por un resto murino original. Ejemplos de restos marco que pueden ser retromutados incluyen, pero no se limitan a, restos canónicos, restos de empaquetado de interfaz, restos originales inusuales que se encuentran cerca del sitio de unión restos en la "Zona Vernier" (que forma una plataforma sobre la que las CDR descansan) (Foote y Winter, 1992. *J. Mol Biol.* 224, 487-499), y los cercanos a la CDR H3.
50

55 Como se usa en el presente documento, un "cambio conservador" se refiere a las alteraciones que son, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambio en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos de los

polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando se hace referencia a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención, un cambio conservador significa una sustitución de aminoácido que no hace al anticuerpo incapaz de unirse al receptor sujeto. Los expertos en la técnica serán capaces de predecir qué sustituciones de aminoácidos se pueden hacer mientras se mantiene una alta probabilidad de ser conformacionalmente y antigénicamente neutras. Dichas orientaciones se presentan, por ejemplo, en Berzofsky (1985), *Science* 229:932-940 y Bowie et al. (1990) *Science* 247:1306-1310. Los factores que se considera que afectan la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no se limitan a: (a) sustitución de aminoácidos hidrófobos es menos probable que afecte a la antigenicidad dado que los restos hidrófobos es más probable que se localicen en el interior de una proteína; (b) la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares es menos probable que afecte a la conformación debido a que el aminoácido sustituido imita estructuralmente el aminoácido nativo; y (c) la alteración de las secuencias conservadas evolutivamente es probable que afecte negativamente a la conformación ya que tal conservación indica que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional. Un experto normal en la técnica será capaz de evaluar alteraciones en la conformación de la proteína utilizando ensayos muy conocidos, tales como, pero sin limitarse a, procedimientos de fijación de microcomplemento (Wasserman et al., (1961) *J. Immunol* 87:290-295; Levine et al. (1967) *Meth Enzymol* 11:928-936) y a través de estudios de unión que utilizan anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (Lewis et al. (1983) *Biochem* 22:948-954).

Además, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de anticuerpo que, cuando se administra a un ser humano o animal, es suficiente para producir un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad eficaz se determina fácilmente por un experto en la técnica siguiendo los procedimientos de rutina.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar", "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la prevención de la recurrencia o aparición de uno o más síntomas de un trastorno en un sujeto resultante de la administración de un agente profiláctico o terapéutico.

Construcción de Anticuerpos Humanizados

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones específicas incluidas en el presente documento. Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a detalles específicos de algunas realizaciones, de las mismas, no se pretende que tales detalles deban ser considerados como limitaciones del alcance de la invención.

La presente invención proporciona nuevos procedimientos y composiciones que comprenden anticuerpos muy específicos y muy eficaces que tienen la capacidad de reconocer y unirse específicamente a epítopos específicos de una serie de antígenos β -amiloides. Los anticuerpos habilitados por la enseñanza de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento de la amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la formación de la placa amiloide que incluye amiloidosis secundaria y amiloidosis debida a la edad que incluye, pero no se limita a, trastornos neurológicos como la Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia con cuerpos de Lewy (LBD), síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); complejo de Parkinson-Demencia de Guam; así como otras enfermedades que se basan en o están asociadas con proteínas amiloides tales como la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt Jacob, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés, enfermedad de Parkinson, la demencia relacionada con el HIV, la ALS (esclerosis lateral amiotrófica), la Diabetes de Aparición en Adultos; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos, y otras enfermedades, incluidas las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloides en los tejidos del sistema visual, tal como la degradación neuronal. Dichas anomalías patológicas pueden aparecer, por ejemplo, en diferentes tejidos del ojo, tales como el córtex visual que conduce a deficiencias visuales corticales; la cámara anterior y el nervio óptico que conducen a glaucoma; el cristalino que conduce a cataratas debido a la deposición de beta-amiloides; el vítreo que conduce a amiloidosis ocular; la retina que conduce a la degeneración retiniana primaria y degeneración macular, por ejemplo, la degeneración macular debida a la edad; el nervio óptico que conduce a drusas en el nervio óptico, a la neuropatía óptica y a la neuritis óptica; y la córnea que conduce a la distrofia reticular.

Una región variable totalmente humanizada o reformada según la presente invención puede ser creada dentro del alcance de la invención diseñando primero una secuencia de aminoácidos de la región variable que contiene CDR no humano, particularmente derivados de roedores, pero especialmente CDR derivados del anticuerpo ACI-01-Ab7C2 murino (denominado "mC2" a lo largo de la solicitud y depositado el 1 diciembre de 2005 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest y número de acceso dado el DSM ACC2750) incrustado en secuencias marco derivadas de humano. Las CDR no humanas, particularmente derivadas de roedores, que pueden obtenerse a partir del anticuerpo según la presente invención, proporcionan la especificidad deseada. En consecuencia, estos restos tienen que ser incluidos en el diseño de la región variable reformada esencialmente sin cambios. Cualquier modificación debería estar restringida a un mínimo y observada atentamente para los cambios en la especificidad y afinidad del anticuerpo. Por otra parte, los restos marco en teoría se pueden derivar de cualquier región variable humana.

Con el fin de crear un anticuerpo reformado que muestre una aceptable o incluso una mejorada afinidad, deben escogerse unas secuencias marco humanas, que sean igualmente convenientes para la creación de una región variable reformada y para la retención de la afinidad del anticuerpo.

5 Con el fin de alcanzar este objetivo, se desarrolló la estrategia de mejor ajuste. Como se sabe que las secuencias marco sirven para mantener las CDR en su correcta orientación espacial para la interacción con el antígeno, y que los restos marco pueden a veces incluso participar en la unión al antígeno, esta estrategia pretende minimizar los cambios que podrían afectar negativamente a la estructura tridimensional del anticuerpo derivando la secuencia marco humana utilizada para reformar el anticuerpo de la región variable humana que sea la más homóloga o similar a la región variable no humana, particularmente derivada de roedores. Esto maximizará también la probabilidad de
10 que la afinidad sea retenida en el anticuerpo reformado.

A su nivel más simple, la estrategia de "mejor ajuste" implica la comparación de la región V del roedor donante con todas las secuencias conocidas de aminoácidos de la región V humana, y después seleccionar la más homóloga para proporcionar las regiones marcoceptoras para los ejercicios de humanización. En realidad, existen otros diversos factores que deberían ser considerados, y que pueden influir en la selección final de las regiones marcoceptoras. Las predicciones de modelado molecular pueden usarse en este sentido antes de cualquier trabajo experimental en un intento de maximizar la afinidad del anticuerpo reformado resultante. Esencialmente, el objetivo del modelado es predecir qué restos clave (si los hay) del marco humano más homólogo debería dejarse como en el roedor para obtener la mejor afinidad en el anticuerpo reformado.

En una realización de la invención, las CDR pueden obtenerse de anticuerpo monoclonal de ratón, particularmente de anticuerpo monoclonal ACI-01-Ab7C2 de ratón (denominado "mC2" a lo largo de la solicitud) descrito en la solicitud en tramitación junto con la presente EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005.

Las células de hibridoma FP-12H3-C2, productoras de anticuerpo monoclonal ACI-01-Ab7C2 de ratón (nombrado "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se depositaron el 1 diciembre de 2005 en la solicitud en tramitación junto con la presente n.º EP05027092.5 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest y con el n.º de acceso dado de DSM ACC2750.

El anticuerpo de ratón se podrá cultivar contra un constructo antígeno supramolecular que comprende un péptido antígeno correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide, particularmente el péptido β -amiloide $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, modificado con un resto hidrófobo tal como, por ejemplo, ácido palmítico o un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o una combinación de ambos, en donde el resto hidrófobo e hidrófilo, respectivamente, está covalentemente unido a cada uno de los extremos del péptido antígeno a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado que pueda servir como un dispositivo de conexión para el acoplamiento del resto hidrófobo e hidrófilo al fragmento de péptido. Cuando se utiliza un PEG como resto hidrófilo, el extremo PEG libre se une covalentemente a la fosfatidiletanolamina o a cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar el constructo antígeno en la bicapa de un liposoma.

En particular, un anticuerpo de ratón se puede cultivar contra un constructo antígeno supramolecular que comprende un péptido antígeno correspondiente a la secuencia de aminoácidos del péptido β -amiloide $A\beta_{1-16}$ modificado con un resto hidrófilo tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), el resto hidrófilo se une covalentemente a cada uno de los extremos del péptido antígeno a través de al menos uno, particularmente uno o dos aminoácidos, tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína o cualquier otro aminoácido o análogo de aminoácido adecuado que pueda servir como un dispositivo de conexión para acoplar el resto hidrófobo e hidrófilo al fragmento de péptido. Cuando se utiliza un PEG como resto hidrófilo, los extremos PEG libres se unen covalentemente a la fosfatidiletanolamina o a cualquier otro compuesto adecuado para funcionar como el elemento de anclaje, por ejemplo, para incrustar el constructo antígeno en la bicapa de un liposoma.

En una realización de la invención, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que comprende en la región variable al menos una CDR de origen no humano incrustada en una o más regiones marco derivadas de humano o primate y combinada con una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o primate, cuyo anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo es capaz de reconocer y unirse específicamente al péptido monómero β -amiloide.

Las CDR contienen los restos más propensos a unirse al antígeno y se deben retener en el anticuerpo reformado. Las CDR se definen por la secuencia según Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edición, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Las CDR se dividen en clases canónicas (Chothia *et al.*, 1989 *Nature*, 342, 877-883) donde los restos clave determinan en gran medida la conformación estructural del bucle de la CDR. Estos restos son casi siempre retenidos en el anticuerpo reformado.

En el proceso para preparar un anticuerpo humanizado según la invención, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables cadena pesada y de cadena ligera de C2 (V_H y V_K) se comparan con las secuencias V_H y V_K de anticuerpos de roedor en las bases de datos del NCBI y de Kabat.

5 El gen de la línea germinal de ratón con la mayor coincidencia con la V_K de C2 es bb1, Locus MMU231201 (Schable *et al.*, 1999). Una comparación revela que dos aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, ambos localizados dentro de la CDRL1. Se pueden encontrar anticuerpos murinos maduros con similar, pero no idéntica, secuencia. Varios tienen una CDRL2 idéntica y una CDRL3 idéntica, pero la CDRL1 de C2 parece ser única. La comparación con las secuencias V_K de la línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo VKII son los de mejor coincidencia con V_K de C2 (Cox *et al.*, 1994). De ese modo, V_K de C2 se puede asignar al subgrupo MuVKII de Kabat.

La secuencia DPK15 junto con HuJ_K1 de la región J humana pueden ser seleccionadas para proporcionar las secuencias marco aceptoras para el V_K humanizado.

15 Se han definido los restos en la interfaz entre las cadenas variables ligera y pesada (Chothia *et al.*, 1985 *J. Mol. Biol.*, 186, 651-663). Por lo general, estos son retenidos en el anticuerpo reformado. El Phe en la posición 87 de la V_K C2 de ratón es inusual en la interfaz, donde un Tyr es más común en el subgrupo VKII, indicando que este resto marco puede ser importante para la actividad del anticuerpo. Tyr 87 está presente en la línea germinal humana y en el C2VK humanizado.

20 Las secuencias V_K humanizadas, por ello, pueden ser diseñadas de tal manera que la C2HuVK1 consiste en CDR de V_K C2 de ratón con marcos de DPK 15 y J_K1 humano. En una realización específica de la invención, los restos murinos pueden ser sustituidos en la región marco humana en las posiciones 45 y/o 87 y/o 50 y/o 53. El resto 45 puede estar involucrado en el apoyo a la conformación de las CDR. El resto 87 está localizado en la interfaz de los dominios V_H y V_K . Por lo tanto, estos restos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión al anticuerpo.

25 El gen de la línea germinal de ratón con la mayor coincidencia con AF V_H C2 es VH7183, Locus AF120466, (Langdon *et al.*, 2000). La comparación con secuencias V_H de la línea germinal humana muestra que genes del subgrupo V_HIII son los de mejor coincidencia con V_H C2. El AF V_H C2 se puede asignar al subgrupo MuV_HIII de Kabat. La secuencia DP54 junto con el HuJ_H6 de la región J humana pueden ser seleccionadas para proporcionar las secuencias marco aceptoras para la V_H humanizado.

30 La comparación muestra que hay nueve diferencias en aminoácidos entre las secuencias V_H C2 y la secuencia de la línea germinal humana aceptora DP54 y J_H6, estando la mayoría localizada dentro del CDRH2. Se encuentran anticuerpos de murino maduro con CDRH1 idéntica o similar (un resto diferente) o con CDRH2 similar (un resto diferente), pero ninguno con las tres CDR idénticas a AF V_H C2. La CDRH3 del anticuerpo C2 es inusualmente corta, consistiendo sólo en tres restos. Sin embargo, otros anticuerpos se encuentran en la base de datos con CDRH3 de esta longitud. El resto 47 de V_H C2 es Leu en lugar del más común Trp, y el resto 94 es Ser en lugar del normal Arg, indicando que estos restos marco pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo.

35 Se pueden diseñar varias secuencias V_H humanizadas. El C2HuVH1 consiste en las CDR de AF V_H C2 con marcos de DP54 y HuJ_H6. En una realización específica de la invención, los restos murinos pueden ser sustituidos en la región marco humana en las posiciones 47 o 94, o en ambas. El resto 47 en el marco 2 hace contacto tanto con las CDR como con el dominio V_K . El resto 94 puede estar involucrado en el apoyo a la conformación de las CDR. Por lo tanto, estos restos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión al anticuerpo.

40 Se pueden diseñar regiones HCVR y LCVR diferentes que comprenden las CDR no humanas obtenibles del anticuerpo donante, por ejemplo, un anticuerpo murino, incrustado en las regiones marco derivadas de humano o de primate nativas o modificadas. La modificación puede afectar particularmente a un intercambio de uno o más restos de aminoácidos en la región marco por restos no humanos, particularmente restos murinos, encontrados con más frecuencia en esta posición en los respectivos subgrupos, o por restos que tienen propiedades similares a las encontradas con mayor frecuencia en esta posición en los respectivos subgrupos.

45 La modificación de las secuencias marco de la región marco sirven para mantener las CDR en su correcta orientación espacial para la interacción con el antígeno, y que los restos marco pueden a veces incluso participar en la unión al antígeno. En una realización de la invención se toman medidas para adaptar adicionalmente las secuencias marco humanas seleccionadas para hacerlas más similares a las secuencias de los marcos del roedor para maximizar la probabilidad de que la afinidad sea retenida en el anticuerpo reformado.

En consecuencia, pueden sustituirse restos murinos en la región marco humana. En particular, los restos murinos pueden ser sustituidos en la región marco humana de la región Variable de Cadena Pesada (HCVR) en las posiciones 47 o 94 o en ambas, y en la región marco humana de la región Variable de Cadena Ligera (LCVR) en las posiciones 45 y/o 87 y/o 50 y/o 53, respectivamente.

55 Los restos encontrados en las posiciones indicadas anteriormente en la región marco humana pueden intercambiarse por restos murinos encontrados con más frecuencia en esta posición en los respectivos subgrupos. En particular, el Trp en la posición 47 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región

- Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15, puede ser reemplazado por un Leu o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, el Trp en la posición 47 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15 puede además ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en norleucina, Ile, Val, Met, Ala, y Phe, particularmente por Ile. Se puede considerar que las sustituciones conservadoras alternativas son conformacionalmente y antigénicamente neutras.
- Arg en la posición 94 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15, puede ser reemplazado por Ser o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, Arg en la posición 94 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 15, puede ser, alternativamente, reemplazada por Thr.

En otra realización de la invención, ambos restos pueden ser reemplazados en el anticuerpo humanizado.

- Gln en la posición 45 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 puede ser reemplazada por Lys o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, Gln en la posición 45 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12, puede ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, y Asn, particularmente por Arg.

- Leu en la posición 50 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 puede ser reemplazado por Lys o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, Leu en la posición 50 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12, puede ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gln, y Asn, particularmente por Arg.

- Asn en la posición 53 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 puede ser reemplazado por His y Gln o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, Asn en la posición 53 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12, puede ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Lys y Arg.

- Thr en la posición 87 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12 puede ser reemplazado por Phe o por un resto aminoácido que tenga propiedades similares y cuya sustitución conduzca a alteraciones que sean, sustancialmente, conformacionalmente o antigénicamente neutras, produciendo mínimos cambios en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o produciendo mínimos cambios en los determinantes antígenos. En particular, Tyr en la posición 87 de Kabat en la región marco derivada de humano o de primate de la Región Variable de Cadena Ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 12, puede ser reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Val, Ile y Ala, particularmente por Leu.

- La región variable así obtenida que comprende al menos un CDR de origen no humano incrustado en una o más regiones marco derivadas de humano o primate se pueden combinar entonces con una región constante derivada de un anticuerpo de origen humano o primate, particularmente con regiones constantes IgG4 o κ humanas, respectivamente. La región constante de IgG4 se puede modificar, por ejemplo, cambiando Serina en la posición 228 en la región bisagra por Prolina (HulG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro entre cadenas y previene la formación de moléculas mitad que pueden darse en las preparaciones IgG4 humanas nativas. La región constante IgG4 puede modificarse además por la supresión del terminal Lys en la posición 439 como se muestra en la SEQ ID NO: 16.

Las regiones variables modificadas pueden ser construidas por procedimientos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, la recombinación de PCR de superposición. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, AF

ChV_H C2 y ChV_K C2, se pueden utilizar como moldes para la mutagénesis de las regiones marco en las secuencias requeridas. Conjuntos de pares de cebadores mutagénicos son sintetizados abarcando las regiones a ser alteradas. Los casetes de expresión V_H y V_K humanizados producidos pueden ser clonados en vectores de clonación apropiados conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, pUC19. Después de que se confirma que la secuencia de ADN completa es correcta para cada V_H y V_K, los genes de la región V de cadena pesada y ligera modificados pueden ser escindidos a partir del vector de clonación como casetes de expresión y transferidos a vectores de expresión apropiados.

Región Fc mutante

La presente invención proporciona procedimientos para hacer una variante de polipéptido, particularmente un anticuerpo que comprende una región variante. Un anticuerpo de este tipo que comprende, por ejemplo, una región Fc variante puede utilizarse para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como la amiloidosis.

El polipéptido "original" "de partida" o "no variante" se prepara utilizando la tecnología disponible en la técnica para generar polipéptidos que comprende, por ejemplo, una región Fc. En una realización preferida de la invención, el polipéptido original es un anticuerpo y procedimientos a modo de ejemplo para la generación de anticuerpos se describen con más detalle en las secciones siguientes. El polipéptido original puede, sin embargo, ser cualquier otro polipéptido que comprende una región Fc, por ejemplo, una inmunoadhesina. Los procedimientos para preparar inmunoadhesinas se elaboran con más detalle a continuación.

En una realización alternativa, la región Fc variante puede ser generada según los procedimientos descritos en el presente documento y esta "región Fc variante" puede fusionarse con un polipéptido heterólogo de elección, tal como un dominio variable de anticuerpo o dominio de unión de un receptor o ligando.

El polipéptido original comprende una región Fc. En general, la región Fc del polipéptido original comprenderá una región Fc de secuencia nativa y, preferiblemente, una región Fc de secuencia nativa humana. Sin embargo, la región Fc del polipéptido original puede tener una o más alteraciones o modificaciones de la secuencia de aminoácidos pre-existente a partir de una región Fc de secuencia nativa. Por ejemplo, la actividad de unión a C1q de la región Fc puede haber sido previamente alterada (otros tipos de modificaciones de la región Fc se describen con más detalle a continuación). En una realización adicional, la región Fc del polipéptido original es "conceptual" y, mientras no exista físicamente, el ingeniero de anticuerpos puede decidir por una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante deseada y generar un polipéptido que comprende esa secuencia o un ADN que codifique la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante deseada.

En una realización preferida de la invención, sin embargo, se dispone de un ácido nucleico que codifica una región Fc de un polipéptido original y esta secuencia de ácido nucleico es alterada para generar una secuencia de ácido nucleico variante que codifica la D265A variante de la región Fc.

El ADN que codifica una variante de secuencia de aminoácidos del polipéptido de partida se prepara por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis mediante PCR y mutagénesis de casete de un ADN preparado anteriormente que codifica el polipéptido.

La mutagénesis dirigida al sitio es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución. Este tecnología es bien conocida en la técnica (véase, *p. ej.*, Carter et al., *Nucleic Acids Res* 13:4431-4443 (1985) y Kunkel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82:488 (1987)). En resumen, en la realización de la mutagénesis de ADN dirigida al sitio, el ADN de partida es alterado hibridando primero un oligonucleótido que codifica la mutación deseada a una sola cadena de tal ADN de partida. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena completa, utilizando el oligonucleótido hibridado como cebador, y utilizando la única cadena de ADN de partida como molde. Así, el oligonucleótido que codifica la mutación deseada se incorpora en el ADN de doble cadena resultante.

La mutagénesis mediante PCR es también adecuada para hacer variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido de partida. Véase Higuchi, en *PCR Protocols*, pág. 177-183 (Academic Press, 1990); y Vallette et al., *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989). En resumen, cuando se usan pequeñas cantidades de ADN molde como material de partida en una PCR, los cebadores que difieren ligeramente en secuencia de la región correspondiente en un ADN molde se pueden utilizar para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde sólo en las posiciones donde los cebadores difieren del molde.

Otro procedimiento para preparar variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al., *Gene* 34:315-323 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN polipéptido de partida que mutará. Se identifican el codón o codones en el ADN de partida que mutará. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción a cada lado del sitio o sitios de mutación identificados. Si no existen tales sitios de restricción, pueden ser generados utilizando el procedimiento de mutagénesis mediada por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en las localizaciones apropiadas en el ADN polipéptido de partida. El ADN plásmido es cortado en estos sitios para linealizarlo. Un oligonucleótido de doble cadena que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero conteniendo la mutación o mutaciones deseadas se sintetiza utilizando

procedimientos estándar, en donde las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizan por separado y después se hibridan juntas utilizando técnicas estándar. Este oligonucleótido de doble cadena se conoce como casete. Este casete está diseñado para tener extremos 5' y 3' que sean compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de tal manera que pueda ser directamente ligado al plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de ADN mutada.

Como alternativa, o adicionalmente, se puede determinar la secuencia de aminoácidos deseada que codifica una variante de polipéptido, y una secuencia de ácido nucleico que codifica tal variante de secuencia de aminoácidos puede ser generada de forma sintética.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido original se modifica con el fin de generar una región Fc variante con una alterada afinidad o actividad de unión al receptor Fc *in vitro* y/o *in vivo* y una alterada actividad de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) *in vitro* y/o *in vivo* y/o una alterada actividad de la citotoxicidad mediada por células (CDC) *in vitro* y/o *in vivo*.

En general, la modificación implica una o más sustituciones de aminoácidos. La sustitución puede ser, por ejemplo, una "sustitución conservadora". Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la región Fc se pueden realizar mediante la selección de sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o en hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Aparte de las sustituciones de aminoácidos, la presente invención contempla otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la región original con el fin de generar, por ejemplo, un variante de la región Fc con una función efectora alterada.

Con el fin de reducir la unión a una FcR se pueden, por ejemplo, suprimir uno o más restos aminoácidos de la región Fc. En general, se suprimirán uno o más de los restos de la región Fc identificados en el presente documento como que efectúan la unión a FcR con el fin de generar tal variante de la región Fc. En general, no más de uno hasta aproximadamente diez restos de la región Fc se suprimirán según esta realización de la invención. La región Fc del presente documento que comprende una o más supresiones de aminoácidos mantendrá, preferiblemente, al menos aproximadamente 80 %, y preferiblemente al menos aproximadamente 90 %, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, de la región Fc original o de la región Fc humana de la secuencia nativa.

Mediante la introducción de las apropiadas modificaciones en la secuencia de aminoácidos en una región Fc original, por ejemplo, se puede generar una región Fc variante que (a) medie en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más o menos eficazmente y/o (b) se una a un receptor gamma Fc (Fc.gamma.R) con más o menos la afinidad del polipéptido original. Tales variantes de la región Fc comprenderán, generalmente, al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. Se cree que es particularmente deseable combinar las modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, etc., sustituciones en dicho lugar, p. ej., de las posiciones de la región Fc específica identificadas en el presente documento.

Por ejemplo, en el contexto de IgG1, una variante de la región Fc se puede generar con unión reducida al Fc.gamma.R introduciendo una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc. Véase, p. ej., Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Las variantes de IgG1 que presentan unión reducida a Fc.gamma.RI, incluyen las que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 327 o 329. Véase, p. ej., Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Las variantes de IgG1 que presentan unión reducida a Fc.gamma.RII incluyen las que comprenden una modificación de aminoácidos en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 o 439. Véase, p. ej., Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Las variantes de la región Fc de IgG1 que presentan unión reducida a Fc.gamma.RIII incluyen las que comprenden una modificación de aminoácido en la región Fc en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 o 437. Véase, *p. ej.*, Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

- 5 Un experto corriente en la técnica comprenderá que pueden obtenerse efectos similares variando los restos específicos en otras regiones Fc de Ig, aunque la numeración de los restos puede ser diferente. Véase, *p. ej.*, Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Se puede diseñar una región Fc con la función efectora alterada, por ejemplo, modificando la unión a C1q y/o la unión a FcR y cambiando, de ese modo, la actividad CDC y/o la actividad ADCC. Por ejemplo, se puede generar una 10 región Fc variante con una mejorada unión a C1q y mejorada unión a Fc.gamma.RIII; *p. ej.*, teniendo tanto actividad ADCC mejorada como actividad CDC mejorada. Como alternativa, cuando se desea que la función efectora se reduzca o desaparezca, se puede diseñar una región Fc variante con actividad CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras realizaciones, puede aumentarse sólo una de estas actividades, y opcionalmente también reducir la otra actividad, *p. ej.*, para generar una región Fc variante con actividad ADCC mejorada, pero actividad CDC 15 reducida y viceversa. Véase, *p. ej.*, Petra, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Con respecto a adicionales alteraciones de la secuencia de aminoácidos, cualquier resto cisteína no involucrado en mantener la conformación apropiada de la variante de polipéptido puede también sustituirse, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. Véase, *p. ej.*, Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

20 Otro tipo de sustitución de aminoácidos sirve para alterar el modelo de glicosilación del polipéptido. Esto puede lograrse suprimiendo uno o más grupos carbohidratos encontrados en el polipéptido, y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido. Normalmente, la glicosilación de polipéptidos es bien ligada a N o bien ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier 25 aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa o a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina. La adición de sitios de glicosilación al polipéptido se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las 30 secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligada a N). La alteración puede también hacerse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido original (para sitios de glicosilación ligada a O). Una variante de glicosilación de ejemplo tiene una sustitución de aminoácidos de resto Asn 297 de cadena pesada. Véase, *p. ej.*, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

35 Además, la clase, subclase o alotipo de la región Fc puede ser alterada por una o más sustituciones de aminoácidos para generar una región Fc con una secuencia de aminoácidos más homóloga a una clase, subclase o alotipo diferente según se desee. Por ejemplo, una región Fc de murino puede ser alterada para generar una secuencia de aminoácidos más homóloga a una región Fc humana; una región Fc de IgG1 de alotipo no-A humana puede ser modificada para lograr una región Fc de IgG1 de alotipo A humana, etc. En una realización, la modificación o 40 modificaciones de amino en el presente documento que alteran la unión al FcR y/o la actividad de ADCC se hacen en el dominio CH2 de la región Fc y el dominio CH3 se suprime o reemplaza con otro dominio de dimerización. Preferiblemente, sin embargo, el dominio CH3 se retiene (aparte de las modificaciones de aminoácidos en dicho lugar que alteran la función efectora como se ha descrito en el presente documento). Véase, *p. ej.*, Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

45 Ensayos de unión

Se puede evaluar la capacidad de la variante de polipéptido para unirse a un FcR. Cuando el FcR es un receptor Fc de alta afinidad, tal como Fc.gamma.RI, FcRn o Fc.gamma.RIIIA-V158, la unión se puede medir por titulación de variante de polipéptido monomérico y midiendo la variante de polipéptido unida utilizando un anticuerpo que se une específicamente a la variante de polipéptido en un formato de ELISA estándar. Véase, *p. ej.*, Presta, patente de 50 EE.UU. n.º 6.737.056. Los ensayos de unión a FcR para FcR de baja afinidad son bien conocidos en la técnica y se describen en, *inter alia*, Presta, patente de EE.UU. n.º 6.737.056.

Para evaluar la actividad de ADCC de la variante de polipéptido, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro* utilizando proporciones variables de efector:diana. Útiles "células efectoras" para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células aniquilantes naturales (NK). Como alternativa, o 55 adicionalmente, la actividad de ADCC de la variante de polipéptido se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., PNAS (EE.UU.) 95:652-656 (1998).

Vectores de expresión

Cualquier vector de expresión adecuado puede ser utilizado para realizar la invención. Por ejemplo, una persona con

experiencia normal en la técnica podrá expresar IgG1 en, por ejemplo, *pSVgpt*. El vector *pSVgpt* de expresión se basa en el *pSV₂gpt* (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *gpt* para la selección en células de mamífero, la región potenciadora de inmunoglobulina de cadena pesada de murino, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y las secuencias de Poli A de SV40. La región variable de cadena pesada para expresión se inserta como un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

El vector *pSVhyg* de expresión incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen *hyg* para selección en células de mamífero, la región potenciadora de inmunoglobulina de cadena pesada de murino, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante kappa e incluye el potenciador kappa y las secuencias de Poli A de SV40. La región variable de cadena ligera para expresión se inserta como un fragmento *HindIII* a *BamHI*.

Después, se confirma que la secuencia de ADN es correcta para los V_H y V_K humanizados en los vectores de expresión.

Para la producción de anticuerpo, los vectores de expresión de cadena pesada y ligera humanizados pueden ser introducidos en las líneas de células de producción apropiadas conocidas en la técnica tal como, por ejemplo, células NS0. La introducción de los vectores de expresión puede realizarse por co-transfección mediante electroporación o cualquier otra tecnología de transformación adecuada disponible en la técnica. Las líneas de células productoras de anticuerpos pueden entonces ser seleccionadas y expandidas, y los anticuerpos humanizados ser purificados. Los anticuerpos purificados pueden entonces ser analizados por técnicas estándares tal como SDS-PAGE.

Anticuerpo con afinidad, especificidad y estabilidad mejoradas

La secuencia CDRL2 ("KVSNRFS") de anticuerpo C2 de ratón puede ser modificada ligeramente sin afectar negativamente a la actividad del anticuerpo. Las sustituciones conservadoras pueden hacerse a través del intercambio de R por la K en la posición 50 y de S por la N en la posición 53. Las dos secuencias CDRL2 alternativas son, por lo tanto, "RVSNRFS" y respectivamente "KVSSRFS". Estas se incorporan en la secuencia V_K de murino sin ningún otro cambio, como $VK-R$ C2 y $VK-S$ C2, respectivamente.

La afinidad, especificidad y estabilidad de un anticuerpo según la invención, como se describe anteriormente en el presente documento, o un fragmento del mismo pueden ser modificadas por cambios de su perfil o modelo de glicosilación dando como resultado valores terapéuticos mejorados.

Para lograr este cambio en el modelo de glicosilación, las células anfitrionas pueden ser diseñadas de manera que sean capaces de expresar un intervalo preferido de una actividad glicosiltransferasa modificadora de glicoproteínas que aumenta el complejo de oligosacáridos ligados a N que transportan un GlcNAc bisecado. Además, pueden obtenerse glicofomas modificadas de glicoproteínas, por ejemplo, anticuerpos, que incluyen moléculas de anticuerpos completas, fragmentos de anticuerpos, o proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina, que tiene una citotoxicidad celular mediada por Fc mejorada.

Los procedimientos de obtención de anticuerpos con modelo de glicosilación modificado son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en EP1071700, US2005272128, Ferrara et al., (2006) *J Biol Chem* 281(8), 5032-5036; Ferrara et al., (2006) *Biotechnology and Bioengineering* 93(5), 851-861.

Preparación farmacéutica y administración

Los anticuerpos según la invención, pero particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pueden ser preparados en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo según la invención y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en particular, el anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo se combina con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas de tampón fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica según la invención puede lograrse según metodología estándar conocida por los expertos en la técnica.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en forma de un sólido, un líquido o un aerosol en una dosis adecuada, farmacéuticamente eficaz. Ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras se pueden administrar por vía oral. Las cremas terapéuticas se pueden administrar por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables pueden administrarse localmente, por ejemplo, en un sitio tumoral, o pueden ser implantadas para la liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Ejemplos de composiciones líquidas incluyen

formulaciones adaptadas para inyección por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial, y formulaciones para administración tópica e intraocular. Ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones de inhalación para su administración a los pulmones.

5 Las composiciones pueden ser administradas por rutas de administración estándares. En general, la composición se puede administrar por vía tópica, oral, rectal, nasal, interdermal, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular). Además, la composición puede incorporarse en matrices de liberación lenta, tal como polímeros biodegradables, siendo los polímeros implantados en las proximidades de donde se desea hacer la entrega, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El procedimiento incluye la administración de una sola dosis, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración lenta durante un período de tiempo predeterminado.

10 Una matriz de liberación lenta, como se utiliza en el presente documento es una matriz hecha de materiales, normalmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa mediante enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación lenta se escoge deseablemente por materiales biocompatibles tales como liposomas, polilactidas (ácido poliláctico), poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polilactida-co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, condroitín sulfato, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, poli(vinilpropileno), poli(vinilpirrolidona) y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno cualquiera de polilactida, poliglicolida o polilactida-co-glicolida (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

15 Es bien conocido por los expertos en la técnica pertinente que la dosificación de la composición dependerá de varios factores tales como, por ejemplo, el estado del ser a tratar, la composición particular utilizada, y otros factores clínicos tal como peso, tamaño, sexo y estado de salud general del paciente, área de la superficie corporal, compuesto o composición particular que ha de administrarse, otros fármacos que se administran al mismo tiempo, y la vía de administración.

20 La composición se puede administrar en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activa, particularmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación de ADN tal como Pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3 APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS) activadores α -secretasa, inhibidores β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisores, interruptores β en láminas, sustancias de atracción de componentes celulares de aclaramiento/supresión de amiloide beta, inhibidores de amiloide beta truncado N-terminal que incluye amiloide beta 3-42 piroglutamado, moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos" como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de la colinesterasa (ICE) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina, agonistas M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco modificador de amiloide o tau, y suplementos nutritivos tales como, por ejemplo, vitamina B12, cisteína, un precursor de la acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente, farmacéuticamente aceptables, y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades.

25 La materia proteínica farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. En general, el régimen de administración debería estar en el intervalo entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo según la invención, particularmente en un intervalo de 1,0 μ g y 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo entre 1,0 μ g y 100 μ g, con todos los números individuales que entren dentro de estos intervalos siendo también parte de la invención. Si la administración se produce a través de una infusión continua, una dosis más adecuada puede estar en el intervalo de entre unidades de 0,01 μ g y 10 mg por kilogramo de peso corporal por hora con todos los números individuales que entren dentro de estos intervalos siendo también parte de la invención.

30 Generalmente, la administración será parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitarse a ellos, propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los disolventes acuosos pueden elegirse del grupo que consiste en agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas acuosas, que incluyen soluciones salinas y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También pueden estar presentes los conservantes como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

35 La composición farmacéutica puede comprender, además, portadores proteicos tales como, por ejemplo, seroalbúmina o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Otros agentes biológicamente activos pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependiente de su uso previsto.

5 Cuando la diana de unión está localizada en el cerebro, algunas realizaciones de la invención contemplan que el anticuerpo o fragmento activo del mismo atraviese la barrera hematoencefálica. Algunas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de manera que el anticuerpo o fragmento activo del mismo puede ser fácilmente introducido en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios planteamientos conocidos en la técnica para el transporte de moléculas a través de él que incluyen, pero no limitado a, procedimientos físicos, procedimientos basados en lípidos y procedimientos basados en los receptores y en el canal.

10 Los procedimientos físicos de transporte del anticuerpo o fragmento del mismo activo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, eludir completamente la barrera hematoencefálica, o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Procedimientos de elusión incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, p. ej., Papanastassiou et al., Gene Therapy 9:398-406 (2002)) y la implantación de un dispositivo de entrega en el cerebro (véase, p. ej., Gill et al., Nature Med 9:589-595 (2003); y Gliadel Wafers[®], Guildford Pharmaceutical). Procedimientos de creación de aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos (véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 2002/0038086), presión osmótica (p. ej., por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Volúmenes 1 y 2, Plenum Press, N. Y. (1989))), permeabilización mediante, por ejemplo, la bradicinina o el permeabilizador A-7 (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. n.º 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y transfección de las neuronas que se sitúan en la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (véase, p. ej., la publicación de patente de EE.UU. n.º 2003/0083299).

15 Los procedimientos basados en lípidos de transportar el anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsular el anticuerpo o fragmento activo del mismo en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen a los receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20020025313), y revestir el anticuerpo o fragmento activo del mismo de partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040131692).

20 Procedimientos basados en el receptor y en el canal de transporte del anticuerpo o fragmento activo del mismo a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, utilizar bloqueantes de los glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véanse, p. ej., las publicaciones de las solicitudes de patentes de EE.UU. n.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activar los canales de potasio (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2005/0089473), inhibir los transportadores de fármacos ABC (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de Patente de EE.UU. n.º 2003/0073713); revestir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, p. ej., la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0129186), y llevar a la forma catión a los anticuerpos (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n.º 5.004.697).

Detección/diagnóstico

25 En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades o estados asociados a amiloide. Estos procedimientos incluyen procedimientos inmunológicos conocidos comúnmente utilizados para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en un estado *in situ*.

30 El diagnóstico de una enfermedad o estado asociado a amiloide en un paciente puede lograrse mediante la detección de la unión inmunespecífica de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína amiloide en una muestra o *in situ*, que incluye poner la muestra, o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica sospechosa de contener la proteína amiloide, en contacto con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína amiloide, permitiendo que el anticuerpo se una a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico, detectar la formación de complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína amiloide en la muestra o parte o área del cuerpo específica.

35 Las muestras biológicas que pueden utilizarse en el diagnóstico de una enfermedad o estado asociado a amiloide son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucosidad, fluido cerebroespinal, fluido linfático, humor acuoso del ojo y similares, o muestras de tejido o de células obtenidas de un organismo, tal como tejido neuronal, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína amiloide en una muestra puede usarse cualquier inmunoensayo conocido por los expertos ordinarios en la técnica (véase, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, 555-612) como, por ejemplo, los ensayos que utilizan procedimientos de detección indirecta empleando reactivos secundarios para la detección, ensayos de ELISA e inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos se da, por ejemplo, en WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y W096/29605.

40 Para el diagnóstico *in situ*, el anticuerpo o cualquier parte activa y funcional del mismo se puede administrar al organismo que va a ser diagnosticado mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo,

inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de manera que pueda aparecer una unión específica entre el anticuerpo según la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo anticuerpo/antígeno se puede detectar a través de un marcador unido al anticuerpo o a un fragmento funcional del mismo.

5 Los inmunoensayos utilizados en aplicaciones de diagnóstico normalmente se basan en antígenos, anticuerpos, o reactivos secundarios marcados para la detección. Estas proteínas o reactivos pueden ser marcados con compuestos generalmente conocidos por los expertos en la técnica que incluyen enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas que incluyen partículas coloreadas, tales como oro coloidal y gotas de látex. De éstos, puede utilizarse el marcado radiactivo para casi todos los tipos de ensayos y con las mayores variaciones. Los marcadores enzimáticos conjugados son particularmente útiles cuando debe evitarse la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipo costoso para su uso, proporcionan un procedimiento de detección muy sensible. Los anticuerpos útiles en estos ensayos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

10 Como alternativa, el anticuerpo puede ser marcado indirectamente, por reacción con sustancias marcadas que tienen afinidad por inmunoglobulina, tales como la proteína A o G o segundos anticuerpos. El anticuerpo puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tiene afinidad por la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser conjugado con biotina y el conjugado anticuerpo-biotina detectarse utilizando avidina o estreptavidina marcadas. Del mismo modo, el anticuerpo puede conjugarse a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno detectarse utilizando anticuerpo marcado anti-hapteno.

15 Aquellos de experiencia ordinaria en la técnica conocerán éstos y otros marcadores adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores a anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede lograr utilizando técnicas estándar comúnmente conocidas por los expertos ordinarios en la técnica. Técnicas típicas se describen por Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin Chim Acta 70: 1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al., 1977 (Clin. Chim Acta 81:1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en último lugar son el procedimiento del glutaraldehído, el procedimiento del peryodato y el procedimiento de la dimaleimida.

20 Los inmunoensayos actuales utilizan un procedimiento de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo es marcado indirectamente, por reactividad con un segundo anticuerpo que ha sido marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es, preferiblemente, uno que se une a anticuerpos del animal del que se deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, entonces el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo monoclonal que se utilizará en el ensayo descrito a continuación, este marcador es preferiblemente una bolita revestida de anticuerpo, particularmente una bolita magnética. Para el anticuerpo policlonal que se empleará en el inmunoensayo descrito en el presente documento, la etiqueta es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

25 Un sistema alternativo de doble anticuerpo, a menudo denominado como sistemas de formato rápido porque se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, se pueden emplear también dentro del alcance de la presente invención. El sistema requiere una gran afinidad entre el anticuerpo y el analito. Según una realización de la presente invención, la presencia de la proteína amiloide se determina utilizando un par de anticuerpos, cada uno específico de la proteína amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos es denominado "anticuerpo detector" en el presente documento y el otro de dicho par de anticuerpos es denominado "anticuerpo de captura" en el presente documento. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede utilizar bien como anticuerpo de captura o bien como anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede utilizar como anticuerpo tanto de captura como detector, juntos en un único ensayo. Una realización de la presente invención utiliza, de ese modo, el procedimiento de emparedado de doble anticuerpo para detectar la proteína amiloide en una muestra de fluido biológico. En este procedimiento, el analito (proteína amiloide) se intercala entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, siendo el anticuerpo de captura inmovilizado de forma irreversible sobre un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría un marcador detectable, con el fin de identificar la presencia del emparedado de anticuerpo-analito y, de ese modo, la presencia del analito.

30 Las sustancias en fase sólida de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, bolitas magnéticas, de plástico o de vidrio y portaobjetos que son muy conocidos en el campo del radioinmunoensayo y del inmunoensayo de enzimas. Los procedimientos para acoplar anticuerpos con fases sólidas son también muy conocidos por los expertos en la técnica. Más recientemente, una serie de material poroso, tal como nailon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos han sido empleados como soportes sólidos.

35 La presente invención se refiere también a un kit de diagnóstico para detectar la proteína amiloide en una muestra biológica que comprende una composición como se ha definido anteriormente. Además, la presente invención se refiere al anterior kit de diagnóstico que, además de una composición como se ha definido anteriormente, comprende también un reactivo de detección como se ha definido anteriormente. El término "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. Más específicamente, el anterior término se

refiere a un kit de diagnóstico como se ha descrito en Zrein et al. (1998).

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevas inmunosondas y kits de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y estados asociados con la amiloide que comprenden anticuerpos según la presente invención. Para inmunosondas, los anticuerpos están directa o indirectamente unidos a una molécula reportera adecuada, p. ej., una enzima o un radionucleido. El kit de ensayo incluye un recipiente que contiene uno o más anticuerpos según la presente invención e instrucciones para el uso de los anticuerpos con el fin de que se unan a la proteína amiloide para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlacione con la presencia o ausencia de la proteína amiloide.

10 Ejemplos

Materiales

El desarrollo y la preparación de anticuerpo monoclonal ACI-01-Ab7C2 de ratón (nombrados "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de la solicitud) se describe en la solicitud, en tramitación junto con la presente, EP 05 02 7092.5 presentada el 12.12.2005.

15 Las células FP 12H3-C2 de hibridoma, productoras de anticuerpos ACI-01-Ab7C2 monoclonales de ratón (denominados "mC2" y hC2 para el anticuerpo C2 humanizado, a lo largo de toda la solicitud) se depositaron el 1 de diciembre de 2005 en la solicitud en tramitación junto con la presente n.º EP05027092.5 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest y n.º de acceso otorgado DSM ACC2750.

20 Las células de hibridoma se cultivaron en Medio de Cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal 10 % y antibióticos (Penicilina/Estreptomina). El isotipo del anticuerpo producido se comprobó y se encontró que era, como se esperaba, IgG2b/kappa de ratón.

Ensayo

25 Un ELISA para la unión a Amiloide Beta proporcionó una medida fiable de la potencia de los anticuerpos C2. Los anticuerpos de control positivo, anticuerpo FP-12H3-C2 de murino (Genovac Lote n.º AK379/01), y anticuerpo patrón 1560 de Chemicon (Lote n.º: 0508008791).

Elección de regiones constantes humanas

30 Como el reclutamiento del sistema inmunológico no es deseable para el candidato del anticuerpo clínico, la región constante humana seleccionada para la cadena pesada fue IgG4 humana, modificada para cambiar Serina en la posición 228 en la región de bisagra por Prolina (HuIgG4 Ser-Pro). Esta mutación estabiliza el enlace disulfuro entre cadenas e impide la formación de moléculas mitad que pueden darse en las preparaciones de IgG4 humanas nativas. El anticuerpo expresado a partir de las líneas de células de producción habrá también eliminado la lisina terminal. Las secuencias de regiones HulgG4 Ser-Pro constantes humanas y kappa humana se proporcionan en la SEQ ID NO: 17 y 14, respectivamente.

35 Ejemplo 1 Clonación y Secuenciación de Regiones Variables de Anticuerpos

El ARN total se preparó a partir de 3×10^6 células de hibridoma (un matraz T175) utilizando el kit Qiagen RNeasy mini (n.º de cat.: 74104). El ARN se eluyó en 50 μ l de agua y se comprobó en gel de agarosa 1,2 %. El medio condicionado de las células se mantuvo y se utilizó una muestra para la prueba del ensayo de actividad de anticuerpos.

40 Los ADNc de V_H y V_K se prepararon utilizando la transcriptasa inversa con cebadores de región constante de IgG y κ de ratón. Las primeras cadenas de ADNc fueron amplificadas por PCR utilizando un amplio conjunto de cebadores de secuencias de señales. Los ADNc amplificados se purificaron en gel y se clonaron en el vector pGEM[®] T Easy (Promega). Los clones de V_H y V_K obtenidos fueron cribados para insertos del tamaño esperado por PCR y la secuencia de ADN de clones seleccionados se determinó por secuenciación de ADN automatizada. Las localizaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en las secuencias se determinaron con referencia a otras secuencias de anticuerpos (Kabat E.A. et al., 1991). La convención de numeración de Kabat para las regiones variables del anticuerpo se utiliza a lo largo de toda esta solicitud; en consecuencia, los números de restos pueden diferir del número lineal estricto.

50 La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos deducida para mC2 V_K se muestra en las SEQ ID NO: 29 y 27, respectivamente. Cuatro clones dieron esta idéntica secuencia productiva. Una secuencia V_K aberrante no productiva que surge de la pareja de fusión del hibridoma se encontró también en una serie de clones.

Para V_H mC2, se aislaron dos secuencias productivas diferentes. La secuencia AF V_H mC2 (véase la SEQ ID NO: 30) se encontró en un total de 29 clones, con 14 cambios sencillos de pares de bases en los clones individuales. La

secuencia B V_H mC2 se encontró en un total de 8 clones. Cinco de estos representaban la secuencia mayoritaria, siendo los otros 3 clones variaciones de esta. Es posible que estas secuencias B V_H similares surjan como un objeto de la amplificación por PCR. También se obtuvo un V_H aberrante no productivo del hibridoma C2 y se atribuye a la unión V-D-J defectuosa.

- 5 Con el fin de determinar cuál es el correcto V_H mC2 activo, se prepararon dos anticuerpos quiméricos con las dos secuencias V_H diferentes, AF y B, combinadas con la V_K mC2, a fin de detectar la actividad del anticuerpo correcto.

Ejemplo 2 Construcción de genes de anticuerpo quimérico

10 Un anticuerpo quimérico humano en su forma más común consiste en regiones constantes humanas vinculadas a regiones variables de murino (u otro ser no humano). Un anticuerpo quimérico proporciona una herramienta muy útil, en primer lugar para la confirmación de que se han identificado las regiones variables correctas, en segundo lugar para uso como anticuerpo de control en los ensayos de unión al antígeno con las mismas funciones efectoras y utilizando los mismos reactivos de detección secundaria que un anticuerpo humanizado o de ingeniería y también se puede utilizar para investigar la farmacocinética y otras propiedades de las regiones constantes humanas con referencia a la diana particular del anticuerpo.

15 Se construyeron dos vectores de expresión de cadena pesada quiméricos que consistían en regiones variables mAF V_H C2 o mC2 V_H B vinculadas a la región constante HulgG4 (Ser-Pro) en el vector de expresión pSVgpt (Figura 1). Este se basa en pSV₂gpt (Mulligan y Berg, 1980) e incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen gpt para la selección en células de mamífero, la región potenciadora de inmunoglobulina de cadena pesada de murino, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante y las secuencias de poli A de SV40. La región variable de cadena pesada para expresión se inserta como un fragmento HindIII a BamHI.

20 Se construyó un vector de cadena ligera quimérica que consistió en C2 V_K ligado a la región constante kappa C humana en el vector de expresión pSVhyg (Figura 2). El pSVhyg incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en células bacterianas, el gen hyg para la selección en células de mamíferos, la región potenciadora de inmunoglobulina de cadena pesada de murino, la secuencia genómica que codifica el gen de la región constante kappa y que incluye las secuencias del potenciador kappa y de poli A de SV40. La región variable de cadena ligera para expresión se inserta como un fragmento HindIII a BamHI.

30 Los casetes de expresión para las secuencias V_H y V_K C2 de murino se construyeron mediante la adición de secuencia 5' flanqueadora que incluye el péptido señal líder, el intrón líder y el promotor de inmunoglobulina de murino, y la secuencia 3' flanqueadora que incluye el sitio de empalme y la secuencia del intrón, utilizando los vectores V_H-PCR1 y V_K-PCR1 como moldes (Riechmann et al., 1988). La secuencia de ADN se confirmó que era correcta para el V_H y el V_K en los vectores de expresión quiméricos. Las secuencias de ADN y de aminoácidos de los genes V_H y V_K en los casetes de expresión se muestran en las Figuras 3 y 4.

Ejemplo 3 Expresión de Anticuerpos Quiméricos

3.1 Expresión en líneas de células estables

35 La línea de células anfitrionas para la expresión del anticuerpo era NS0, un mieloma de ratón que no produce inmunoglobulina, obtenido de la European Collection of Animal Cell Cultures, Porton, Reino Unido (ECACC n.º 85110503). Los vectores de expresión de cadena pesada y ligera se co-transfectaron en células NS0 por electroporación. Las colonias que expresan el gen gpt se seleccionaron en el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 0,8 µg/ml de ácido micofenólico y 250 µg/ml de xantina. Los clones de células transfectadas se cribaron para la producción de anticuerpo humano por ELISA para IgG humana. Las líneas de células secretoras de anticuerpos se expandieron y las mejores productoras se seleccionaron y congelaron en nitrógeno líquido. Las líneas celulares de mejores productoras de cada anticuerpo se expandieron en un medio como el anterior pero con sólo el 5 % de FBS. Los anticuerpos quiméricos se purificaron utilizando Prosep[®]-A (Bioprocessing Ltd). La concentración se determinó por ELISA para el anticuerpo 45 humanos IgG_K. Los anticuerpos se analizaron también por SDS-PAGE.

3.2 Expresión transitoria de anticuerpos quiméricos

50 Para acelerar el ensayo de los diferentes anticuerpos quiméricos, se utilizó la expresión transitoria para producir rápidamente pequeñas cantidades de sobrenadante de células que contienen anticuerpo recombinante para la prueba. Los casetes de expresión V_H y V_K mC2 se transfirieron a vectores basados en pcDNA3.1 (Invitrogen) para expresión transitoria. El vector de cadena pesada incluía una región constante de IgG humana. El vector de cadena ligera incluía una región constante kappa humana. Tanto AF V_H mC2 como B V_H mC2 fueron transfectadas con V_K mC2 en células embrionarias humanas (HEK 298) de riñón con reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen n.º de cat.: 11668) según el protocolo suministrado por el fabricante. El medio condicionado se recolectó a partir de células 3 días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó por ELISA para el anticuerpo 55 IgG_K humano.

Ejemplo 4 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos

4.1 Actividad de anticuerpos C2 quiméricos producidos por transfección transitoria

Muestras de medio condicionado de la transfección transitoria para los dos diferentes anticuerpos quiméricos se ensayaron en el ELISA por unión a Amiloide Beta. Los resultados indicaron claramente que la AF VH C2 es la secuencia correcta. El anticuerpo quimérico AF VH C2/VK C2 se une bien en el ensayo, pero el B V_H C2/V_K C2 no muestra ninguna unión en absoluto. El anticuerpo de control de murino Chemicon 1560 mostró una buena unión, pero la unión por el anticuerpo C2 de murino purificado suministrado era deficiente. Debería señalarse que se empleaba un anticuerpo secundario diferente para los anticuerpos de murino con las regiones constantes de ratón en comparación con los anticuerpos quiméricos con regiones constantes humanas, por lo que los resultados no son directamente comparables. El medio condicionado del hibridoma de C2 se encontró después que daba un buen resultado en el ensayo.

4.2 Actividad de los anticuerpos C2 quiméricos purificados

Los dos diferentes anticuerpos quiméricos C2 se purificaron a partir de líneas de células NS0 estables como se describió y se ensayó utilizando el ELISA con Amiloide Beta. Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados obtenidos con anticuerpos expresados de forma transitoria. El anticuerpo C2 ChVH AF/ChVK se une bien en el ELISA y el anticuerpo C2 ChVH B/ChVK no se une en absoluto.

Ejemplo 5 Diseño de Genes de Anticuerpo C2 Humanizado

Las secuencias de aminoácidos V_H y V_K mC2 se compararon con las secuencias V_H y V_K de anticuerpo de roedor en las bases de datos NCBI y Kabat.

5.1 Región variable de cadena ligera

El gen de línea germinal de ratón de mayor coincidencia con el V_K de mC2 es bb1, Locus MMU231201 (Schable et al., 1999). Sólo dos aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, ambos localizados dentro de la CDRL1. Se encuentran anticuerpos de murino maduros con secuencia similar, pero no idéntica. Varios tienen idéntica CDRL2 e idéntica CDRL3, pero la CDRL1 de mC2 parece ser única. La V_K de mC2 se puede asignar al subgrupo MuV_KII de Kabat. La posición 87 de V_K de mC2 es F en lugar de Y, que es más común en el subgrupo, lo que indica que este resto marco puede ser importante para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_K de la línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_KII son los de mejor coincidencia con V_K mC2 (Cox et al., 1994). La secuencia DPK15 junto con el HuJ_K1 de la región J humana se seleccionaron para proporcionar las secuencias marcoceptoras para el V_K humanizado.

Se diseñaron cuatro secuencias V_K humanizadas. El C2HuVK1 consiste en las CDR de V_K de mC2 con marcos de DPK15 y J_K1 humano. En las versiones 2, 3 y 4, se han sustituido restos de murino en el marco en las posiciones 45 u 87, o en ambas. El resto 45 puede estar involucrado en el apoyo a la conformación de las CDR. El resto 87 está localizado en la interfaz de los dominios V_H y V_K. Por lo tanto, estos restos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han realizado en las regiones marco de cadena ligera se muestran en la Tabla 1. Una comparación de las secuencias humanizadas con la secuencia V_K de mC2, y con las DPK15 y J_K1 humano.

5.2 Región Variable de Cadena Pesada

El gen de línea germinal de ratón de mayor coincidencia con el AF V_H de mC2 es VH7183, Locus AF120466 (Landon et al., 2000). La comparación se muestra en la Figura 5. Nueve aminoácidos difieren de esta secuencia de la línea germinal, estando la mayoría localizados dentro de la CDR2. Se encuentran anticuerpos de murino maduro con CDR1 idéntica o similar (un resto diferente) o con CDR2 similar (un resto diferente), pero ninguno con las tres CDR idénticas a AF VH mC2. La CDR3 del anticuerpo mC2 es inusualmente corta, consistiendo en sólo tres restos. Sin embargo, se encuentran otros anticuerpos en la base de datos con CDR3 de esta longitud. El AF VH de mC2 se puede asignar al subgrupo MuV_HIIID de Kabat. El resto 47 de V_H de mC2 es L en lugar del más común W, y el resto 94 es S en lugar del normal R, indicando que estos restos marco pueden ser importantes para la actividad del anticuerpo. La comparación con las secuencias V_H de la línea germinal humana muestra que los genes del subgrupo V_HIII son los de mejor coincidencia con el V_H de mC2. La secuencia DP54 junto con el HuJ_H6 de la región J humana se seleccionó para proporcionar las secuencias marcoceptoras para la V_H humanizada.

Se diseñaron cuatro secuencias V_H humanizadas. El C2HuVH1 consiste en las CDR de AF V_H de mC2 con marcos de DP54 y HuJ_H6. En las versiones 2, 3 y 4 se han sustituido restos de murino en el marco en las posiciones 47 o 94, o en ambas. El resto 47 en el marco 2 hace contacto tanto con las CDR como con el dominio V_K. El resto 94 puede estar involucrado en el apoyo a la conformación de las CDR. Por lo tanto, estos restos pueden ser críticos para el mantenimiento de la unión del anticuerpo.

Las posiciones y cambios que se han hecho en regiones marco de cadena pesada se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo 6 Construcción de Genes de Anticuerpo Humanizado

Las regiones variables modificadas se construyeron mediante el procedimiento de la recombinación por PCR de superposición. Los casetes de expresión para el anticuerpo quimérico, AF ChV_H C2 y ChV_K C2, se utilizaron como moldes para la mutagénesis de las regiones marco para las secuencias requeridas. Conjuntos de pares de cebadores mutagénicos se sintetizaron abarcando las regiones que serían alteradas. Los casetes de expresión de V_H y V_K humanizados producidos se clonaron en pUC19 y se confirmó que toda la secuencia de ADN era correcta para cada V_H y V_K. Los genes de la región V de cadena pesada y ligera modificados se escindieron de pUC19 como casetes de expresión *HindIII* a *BamHI*. Estos fueron transferidos a los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg que incluyen regiones constantes Ser-pro o κ de IgG4 humana, respectivamente, como para los vectores de anticuerpos quiméricos. Se confirmó que la secuencia de ADN era correcta para V_H y V_K humanizadas en los vectores de expresión.

Ejemplo 7 Expresión de Anticuerpos Humanizados

7.1 Expresión en líneas de células estables

Los vectores de expresión de cadena pesada y ligera humanizadas fueron co-transfectados en células NS0 por electroporación, como para la expresión de anticuerpos quiméricos. Líneas de células que producen anticuerpos se seleccionaron y expandieron, y los anticuerpos humanizados se purificaron, exactamente como para el anticuerpo quimérico. Los anticuerpos purificados se analizaron por SDS-PAGE.

7.2 Expresión transitoria de anticuerpos humanizados

Para acelerar las pruebas de los diferentes constructos V_H y V_K humanizados, los casetes de expresión V_H y V_K de C2 humanizados se transfirieron también a los vectores para la expresión transitoria descrita en la Sección 7.2. Los cuatro constructos V_K de C2 humanizados fueron co-transfectados con el constructo quimérico V_H de C2 en células HEK293. Del mismo modo, los cuatro constructos V_H C2 humanizados fueron co-transfectados con el constructo quimérico V_K de C2 en células HEK293. El medio condicionado se recolectó de las células tres días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó por ELISA para anticuerpos IgG_K humanos.

Ejemplo 8 Actividad de anticuerpos de C2 humanizados

8.1 Actividad de anticuerpos C2 humanizados producidos por transfección transitoria

Las muestras de medio condicionado de la transfección transitoria se ensayaron en el ELISA Amiloide Beta. Los resultados obtenidos indican claramente que las versiones 2 y 4 de AF HuVH de C2 de los constructos V_H humanizados son funcionales cuando se combinan con la cadena kappa de C2 quimérico, y son comparables al anticuerpo C2 quimérico en el ensayo. Por el contrario, los anticuerpos que contienen versiones 1 y 3 de AF HuVH C2 en combinación con la cadena kappa de C2 quimérico no muestran ninguna unión en absoluto en el ensayo. Esto indica que la sustitución del resto murino en la posición 94 es esencial para la actividad del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena pesada C2 quimérica combinada con las cuatro cadenas kappa de C2 humanizadas mostraron todas una buena unión, comparable a la del anticuerpo quimérico, en el ELISA.

8.2 Actividad de los anticuerpos C2 humanizados purificados

Ocho anticuerpos humanizados C2 diferentes que comprenden todas las combinaciones de dos cadenas pesadas humanizadas y cuatro cadenas ligeras humanizadas se purificaron a partir de líneas de células NS0 estables como se describió y se ensayó utilizando el ELISA Amiloide Beta (Figura 6).

Los resultados obtenidos indican claramente que los anticuerpos HuVH4 C2 se comportan mejor en el ensayo que los anticuerpos HuVH2 C2. De los anticuerpos HuVH2 C2, el HuVH2/HuVK3 C2 muestra la mejor actividad de unión, pero este es aproximadamente dos veces reducido en comparación con el anticuerpo de control ChVHAF/ChVK C2 quimérico. La actividad de HuVH2/HuVK2 C2 es de cuatro a cinco veces reducida en comparación con el control. Las actividades de los anticuerpos que comprenden C2HuVH4 con las cuatro diferentes cadenas ligeras humanizadas son similares. La actividad más alta se observa para C2HuVH4/HuVK1 y los cuatro anticuerpos están cerca del anticuerpo quimérico de control en el ensayo.

Ejemplo 9 Modificaciones a CDRL2

9.1 Diseño de cadena ligera con CDR2 modificado

Como se señaló anteriormente, muchos anticuerpos comparten la misma secuencia CDRL2 ("KVSNRFS") que el anticuerpo C2. Se decidió probar si CDRL2 podría ser modificado ligeramente sin afectar negativamente a la actividad del anticuerpo. Se seleccionaron dos sustituciones conservadoras: R por K en la posición 50 y S por N en la posición 53. Las dos secuencias CDRL2 alternativas son, por lo tanto, "RVSNRFS" y "KVSSRFS". Estas fueron incorporadas en la secuencia V_K de murino sin ningún otro cambio, como VK-R mC2 y VK-S mC2, respectivamente.

9.2 Expresión transitoria de anticuerpo CDRL2 modificado

Los dos constructos de cadena ligera C2 con CDRL2 modificado descritos en la Sección 11.2.1 se clonaron en el vector de cadena ligera para la expresión transitoria. Cada uno se cotransfectó con el vector V_H C2 quimérico en células HEK293. El medio condicionado se recolectó de las células tres días después de la transfección. La cantidad de anticuerpo producido se determinó por ELISA para anticuerpos IgG_κ humanos.

9.3 Actividad de anticuerpo C2 con CDRL2 modificado

Muestras de medio condicionado de la transfección transitoria de V_{κS} mC2 con CDRL2 modificado combinado con V_H mC2 se ensayaron en el ELISA Amiloide Beta (figura 7). Tanto los anticuerpos VK-R como VK-S son comparables con el anticuerpo C2 quimérico, lo que indica que las modificaciones individuales al CDRL2 escogidas no afectan sensiblemente a la actividad del anticuerpo en el ensayo.

Ejemplo 10 Determinación de la Afinidad

Para evaluar la especificidad y la afinidad de la unión de los anticuerpos (ACI-01-Ab-7-C2) de ratón, quimérico (AF) y humanizados (H4K1, H4K4), se realizó el análisis BIACORE.RTM, utilizando monómeros y fibras de Amiloide Beta 1-42 como antígeno inmovilizado en un chip CM5. La tecnología BIACORE.RTM. utiliza los cambios en el índice de refracción en la capa superficial después de la unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado en la capa. La unión se detecta mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR) de la luz láser que se refracta desde la superficie. El análisis de la cinética de señal sobre la proporción o por debajo de la proporción permite la discriminación entre la interacción no específica y específica. La concentración del anticuerpo utilizado estaba en el intervalo de 0,05 μM a 1,0 μM.

Tabla 1: Especificidad y afinidad de la unión de anticuerpos (ACI-01-Ab-7-C2) de ratón, quimérico (AF) y humanizados (H4K1, H4K4) para monómeros y fibras amiloide beta 1-42.

	k _a (l/Ms)	k _d (l/s)	KD (M)	K _a (l/Ms)	k _d (l/s)	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 de ratón	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
AF quimérico	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
H4K1 humanizado	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
H4K4 humanizado	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Ejemplo 11 Ensayo de unión inmunohistoquímica

11.1 Secciones de cerebro humano

Se obtuvieron cerebros de pacientes sanos, pre-AD, no dementes, y AD, de la Universitätsklinik en Bonn después de la autorización ética. Los cerebros se fijaron en formaldehído y la región del hipocampo se deshidrató, se incorporó en parafina y se cortó en secciones de 5 μm con un microtomo. Las secciones en parafina se almacenaron a temperatura ambiente (RT) hasta su uso. Para material recién preparado, se cortaron criosecciones de 5 μm con un criostato y las secciones se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

11.2 Inmunohistoquímica

Las secciones en parafina se desparafinaron y rehidrataron bañando los portaobjetos en xileno seguido de etanol 100 %, etanol de 90 % y etanol de 70 %. El fondo fue disminuido por incubación durante 30 minutos en H₂O₂ al 10 %, y metanol al 10 % en agua. La recuperación de antígenos se obtuvo incubando los portaobjetos en ácido fórmico 100 % durante 3 minutos. Después de 3 lavados en solución salina tampón Tris (TBS, pH 7,5), el marcado no específico se bloqueó mediante una incubación de 2 horas de los portaobjetos en BSA 10 %, 0,25 % de Triton X-100 en TBS. Después de lavar (3 lavados en TBS), la obstrucción de anticuerpos endógenos se realizó añadiendo una IgG (Biomed) anti-humana no marcada e incubando los portaobjetos en cámaras húmedas durante la noche a RT. Después de otros 3 lavados, el anticuerpo anti-amiloide humano primario se añadió a los portaobjetos y se incubó otras 24 horas a RT. Después del lavado, una IgG (Sigma) antihumana secundaria marcada con fosfatasa alcalina se añadió a los portaobjetos y se incubó durante 2 horas a RT. Después del lavado, los portaobjetos se revelaron con Rojo permanente Líquido (DakoCytomation), se lavaron con agua y se secaron al aire antes del montaje con los medios de montaje permanentes (Corbit-Balsam).

Las criosecciones se fijaron en metanol durante 30 minutos a -80 °C y el fondo se redujo por la adición de H₂O₂ al

metanol frío hasta una concentración final de 10 % e incubando durante 30 minutos a RT. Después de 3 lavados en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,5), el marcado no específico se bloqueó mediante una incubación de 2 horas de las portaobjetos en 10 % de BSA, 0,25 % de Triton X-100 en TBS como anteriormente y el mismo procedimiento de tinción que el que se llevó a cabo anteriormente.

- 5 Las secciones se examinaron con un microscopio DMLB Leica y se fotografiaron utilizando una cámara Leica DC500 y el software Leica FireCam 1.2.0.

10 Ambos anticuerpos A y C humanos marcaron placas de cerebros de pacientes con enfermedad AD (figura 8). Se marcaron tanto las placas difusas como las centrales. Además, las placas difusas en pacientes pre-AD no dementes también podían ser detectadas por los anticuerpos A y C. Amiloide en angiopatía amiloide cerebral (AAC) se marcó con ambos anticuerpos y también se detectó alguna tinción de las neuronas que puede corresponder a amiloide intracelular. No se observó ningún marcado en los cerebros de control de paciente sano. Las placas podían detectarse en secciones de parafina previamente tratadas con ácido fórmico, pero no hubo placas marcadas en secciones de parafina sin tratamiento previo con ácido fórmico y en criosecciones fijadas en metanol. El anticuerpo B humano no detectó placas en secciones de parafina y el anticuerpo de ratón ni tiñó la parafina ni las criosecciones de cerebros humanos.

Abreviaturas:

A = anticuerpo quimérico AF de unión (IgG4)

B = anticuerpo quimérico B sin unión (IgG4)

C = anticuerpo humanizado H4K1 de unión (IgG4)

- 20 Ratón = anticuerpo ACI-01-Ab-C2 (IgG2b) de ratón

Ejemplo 12 Funcionalidad de mC2 en Fibras Amiloides

12.1 *Modificación de la Conformación de Fibras A β 1-42 e Inicio de Desagregación después de la Unión del anticuerpo mC2*

25 Con el fin de evaluar el mecanismo por el que el anticuerpo es capaz de desagregar las fibras beta-amiloide preformadas (A β ₁₋₄₂), se realizó una comparación directa del ensayo de fluorescencia de Tioflavina-T (Th-T) midiendo la desagregación y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido del péptido A β 1-42 marcado con Tirosina 10 y Valina 12 U-¹³C, analizando la conformación secundaria (figura 9A). El anticuerpo mC2 solubilizó el 35,4 % de las fibras A β 1-42 preformadas y simultáneamente indujo un cambio en la conformación secundaria de lámina beta a espiral al azar. La reducción en la población de la conformación de lámina beta con respecto a espiral al azar es del orden del 35 % y está, por lo tanto, en estrecho acuerdo con esa medida utilizando el ensayo de fluorescencia Th-T (figura 9B). Estos datos indican que la unión del anticuerpo mC2 inicia una transición de la estructura secundaria que potencialmente causa una desestabilización de la disposición intermolecular paralela de las láminas beta determinando a una rotura de las fibras alargadas en fragmentos más pequeños.

12.2 *Afinidad de Unión Dependiente de la Conformación del anticuerpo mC2*

35 Dado que es bien conocido en la documentación científica que una proporción de la energía de unión anticuerpo-antígeno se puede utilizar para la modificación dependiente de la energía de la conformación de un antígeno (Blond y Goldberg, 1987), se realizó un experimento de comparación de la afinidad de unión del anticuerpo C2 con la totalidad de una proteína A β 1-42 y con un péptido más pequeño, nueve aminoácidos de longitud, que comprende el epítipo del anticuerpo (figura 10). Para esta comparación las afinidades del anticuerpo C2 humanizado fueron analizadas por ELISA utilizando péptidos biotinilados que cubren la secuencia de aminoácidos completa del epítipo del C2 (producido por Mimotopes y adquirido de ANAWA Trading S.A.) y un péptido A β 1-42 completo biotinilados (Bachem). El análisis se realizó según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Como se demuestra en la Figura 10, el anticuerpo se une con una afinidad 36,0 % mayor al péptido que comprende su epítipo específico (aminoácidos 13-21 de la secuencia A β ₁₋₄₂) que a toda la proteína A β 1-42. Se sugiere, por lo tanto, que la diferencia en energía de afinidad de unión se utilizó para la transición que consume energía de la conformación secundaria de la proteína amiloide para presentar el antígeno en una posición más aceptable para la interacción con el anticuerpo. Esto explica por qué la afinidad del anticuerpo es menor para la nativa (toda la proteína amiloide) que para la subunidad aislada.

Ejemplo 13 Efectos del hC2 anti-amiloide sobre la agregación del péptido amiloide beta 1-42

- 50 Para evaluar la capacidad del anticuerpo hC2 monoclonal beta amiloide antihumano humanizado para mediar en los efectos antiagregantes y desagregantes sobre la Amiloide Beta (A β) se llevó a cabo un ensayo de espectrofluorescencia con tioflavina T.

13.1 *Inhibición del Ensayo de Agregación*

Un polvo liofilizado Aβ1-42 se reconstituyó en hexafluoroisopropanol (HFIP) hasta 1 mM. La solución de péptido se sometió a ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente, se agitó durante la noche, y se elaboraron alícuotas en tubos de microcentrífuga no siliconados. El HFIP se evaporó, después, bajo una corriente de argón. La película de péptido resultante se secó al vacío durante 10 minutos y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para ensayar la inhibición mediada por anticuerpos de la agregación de Aβ1-42, el anticuerpo hC2 se diluyó previamente en PBS y se elaboró una solución de ensayo que contenía los siguientes componentes en un tubo de incubación no siliconado: 3,3 o 0,33 mM de anticuerpo previamente diluido, 10 mM de tioflavina T, 33 mM de Aβ1-42, y 8,2 % de DMSO. Por lo tanto, las relaciones molares finales de anticuerpo frente a Aβ1-42 fueron 1:10 y 1:100. También se prepararon las soluciones de control apropiadas. Las soluciones se incubaron a continuación durante 24 horas a 37 °C, y la espectrofluorescencia (unidades de fluorescencia relativa; RFU) se leyó en seis réplicas en placas negras de 384 pocillos (Perkin-Elmer) en un Espectrofluorímetro FluoroCount Perkin-Elmer. A continuación, se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación según se describe a continuación.

13.2 *Ensayo de Desagregación*

Para ensayar la desagregación mediada por anticuerpos de la Aβ1-42 pre-agregada, un Aβ1-42 de bajo peso molecular, preparado como se ha descrito anteriormente, se reconstituyó como una solución 110 mM en DMSO al 27 % y 1 x PBS. Después, se dejó que esta solución se agregara, a 37 °C durante 24 horas, después de lo cual se añadió lo siguiente: 3,3 o 0,33 mM de anticuerpo pre-diluido, y 10 mM de tioflavina T. Esto dio como resultado a una relación molar de 1:10 y 1:100 de anticuerpo frente a Aβ1-42. Esta solución se incubó después durante 24 horas adicionales a 37 °C. Después, se midió la espectrofluorescencia y se calculó el % de desagregación según se describe a continuación.

13.3 *Cálculo*

La inhibición de la agregación o desagregación se expresa como % de inhibición media o desagregación, respectivamente, ± desviación estándar de la media (SEM) según la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{RFU de control pos.} - \text{RFU de control neg.}) - (\text{RFU de muestra con } A\beta_{1-42} - \text{RFU de muestra sin } A\beta_{1-42})}{(\text{RFU de control pos.} - \text{RFU de control neg.})} \times 100 \%$$

13.4 *Resultado*

13.4.1 *Inhibición de la agregación Aβ1-42*

La inhibición de la agregación Aβ1-42 utilizando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 18. En un anticuerpo a una relación molar de Aβ1-42 de 1:100 la inhibición promedió un 30 % (2 experimentos independientes), mientras que en una relación molar 1:10 la inhibición fue del 80 % (2 experimentos independientes; véase la Tabla 2).

Tabla 2. Inhibición mediada por hC2 de la agregación de Aβ1-42 a unas relaciones molares de 1:100 y 1:10 de anticuerpo frente a Aβ1-42.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo frente a Aβ1-42)	
	1:100	1:10
hC2	30,0 ±4,1 %	80,4 ±6,9 %

13.4.2 *Desagregación de Aβ1-42 pre-agregado*

La desagregación de Aβ1-42 pre-agregado utilizando el anticuerpo hC2 se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 19. En una relación molar de anticuerpo frente a Aβ1-42 de 1:100 la desagregación promedió el 24 %, mientras que a una relación molar de 1:10 la desagregación fue del 32 % (3 experimentos independientes; véase la Tabla 3).

Tabla 3. La desagregación mediada por hC2 de Aβ₁₋₄₂ pre-agregado a unas relaciones molares de anticuerpo frente a Aβ₁₋₄₂ de 1:100 a 1:10.

Anticuerpo	Relación molar (anticuerpo frente a Aβ ₁₋₄₂)	
	1:100	1:10
hC2	23,9 ± 4,4 %	31,9 ± 3,5 %

5 Usando el ensayo de tioflavina T, las propiedades bi-funcionales del anticuerpo hC2 humanizado anti-Aβ se puede demostrar, a saber, que inhibe la agregación de Aβ₁₋₄₂ en la conformación protofibrilar patogénica y además desagrega las protofibrillas de Aβ₁₋₄₂ preformadas. El hC2 inhibió la agregación de Aβ₁₋₄₂ en un 80 % a una relación molar de anticuerpo frente a Aβ₁₋₄₂ de 1:10. La capacidad de hC2 para desagregar protofibrillas de Aβ₁₋₄₂ preagregadas en una relación molar de 1:10 se demostró que era un 32 %.

Ejemplo 14: Unión específica de conformación de mC2 para diferentes clases de Proteína Amiloide

10 Con el fin de evaluar la especificidad de-mC2 para diferentes etapas de la proteína amiloide polimerizada, monómera, polímera soluble y de amiloide fibrilar, se realizó un ELISA revestido con estas diferentes etapas de la beta-amiloide polímera (figura 11). Los monómeros se prepararon según un procedimiento modificado publicado por Klein (2002), beta amiloide polímera soluble según Barghom et al. (2005), mientras que las fibras se realizaron por incubación de amiloide (Bachem, Suiza) con una concentración final de 1 μg/μl en Tris/HCl pH 7,4 a 37 °C durante 5 días, seguido de una etapa de centrifugación (10.000 rpm durante 5 minutos). A continuación, los polímeros de amiloide se revistieron en placas ELISA con una concentración final de 55 μg/ml y se realizó un ELISA de afinidad de unión mediante el uso de un anticuerpo monoclonal de IgG anti-ratón (Jackson) marcado con fosfatasa alcalina. Como se muestra en la Figura 11, el anticuerpo mC2 se une con una mayor afinidad a la beta amiloide polímera soluble que a las fibras y con la menor a los monómeros. Estos datos indican que la unión de anticuerpo está influida por el epítipo de amiloide y por la conformación de los diferentes agregados amiloides.

Ejemplo 15: Mapeo de epítipos de hC2 anticuerpo monoclonal de AC immune

25 El mapeo de epítipos del hC2 anticuerpo monoclonal humanizado se realizó mediante el ELISA utilizando tres diferentes bibliotecas de péptidos. Una biblioteca compuesta por un total de 33 péptidos biotinilados que cubren la secuencia de aminoácidos (aa) completa de la Aβ₁₋₄₂ (producido por Mimotopes y adquirido de ANAWA Trading S.A.), la segunda biblioteca contiene péptidos biotinilados que usan péptido 12 (aa 12-20 de Aβ) de la primera biblioteca de péptidos y que sustituye cada aa en la secuencia por una alanina (véase la tabla 3 a continuación), y la tercera biblioteca contiene péptidos biotinilados 13, 14, o 15 (aa 13-21, 14-22 o 15-23 de Aβ) y que sustituyen en cada caso los últimos aminoácidos por una alanina o por una glicina para el aa 21 que ya es una alanina (véase la tabla 4 a continuación). Un péptido Aβ completo biotinilado se utilizó como control positivo (Bachem). El mapeo de epítipos se efectuó según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). En resumen, las placas revestidas con Estreptavidina (NUNC) fueron bloqueadas con 0,1 % de BSA en PBS durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS-0,05 % de Tween 20, las placas se revistieron durante 1 hora a RT con los diferentes péptidos de la biblioteca, se diluyeron en 0,1 % de BSA, 0,1 % de Azida Sódica en PBS hasta una concentración final de 10 μM. Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 hora a RT con el anticuerpo hC2 o un anticuerpo IgG4 quimérico que no se une a Aβ diluido a 200 ng/ml en 2 % de BSA, 0,1 % Azida Sódica en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con IgG antihumana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina durante 1 h a RT. Después del lavado final, las placas se incubaron con sustrato de fosfatasa (pNPP) y se leyeron a 405 nm utilizando un lector de placas del ELISA.

40 El anticuerpo hC2 monoclonal humanizado se unió específicamente a los péptidos 12, 13, 14, 15 y 16 de la primera biblioteca de péptidos (Figura 17 A). Estos péptidos comprenden aa 12-20, 13-21, 14-22, 15-23 y 16-24 respectivamente de Aβ₁₋₄₂, lo que sugiere que el epítipo se encuentra en la región 12-24 de Aβ. Una segunda biblioteca con sustituciones de alanina se utilizó para determinar el aa crítico para la unión a Aβ₁₂₋₂₀ (VHHQKLVFF). La unión del anticuerpo hC2 se pierde completamente cuando los aminoácidos 16, 17, 19 o 20 son sustituidos por una alanina, lo que indica que estos aa son absolutamente críticos para la unión del anticuerpo a Aβ. 45 La unión del anticuerpo hC2 se pierde parcialmente cuando los aa 15 y 18 son sustituidos.

La unión se perdió también casi por completo cuando el aa 14 fue sustituido por una alanina, lo que indica que el aa 14 es también muy importante para la unión (Figura 17B).

50 Finalmente, se utilizó una tercera biblioteca para determinar si los aa 21, 22 o 23 son críticos para la unión al epítipo. La unión del anticuerpo a los aa 15-23 se redujo cuando el aa 23 fue sustituido por una alanina, lo que indica que el aa 23 es también importante para la unión. La unión se pierde parcialmente cuando el aa 21 fue

sustituido por una glicina y ligeramente perdida cuando el aa 22 fue sustituido por una alanina (Figura 17C).

Ejemplo 16: Neuroprotección por el Anticuerpo hC2

- La capacidad del anticuerpo hC2 para proteger a las neuronas de la degeneración inducida por el oligómero Abeta se evaluó en un ensayo *in vitro*. Las neuronas embrionarias corticales de ratón del 16,5 a 17,5 día fueron aisladas, disociadas, y cultivadas *in vitro* en medios N3-F12. Las células se desarrollaron durante nueve días en total, y se alimentaron en el día 3 y el día en el que se añadió oligómero Abeta, u oligómero Abeta más anticuerpo hC2 anti-Abeta. En el día cinco ("4 días de Abeta") o en el día seis ("3 días de Abeta"), algunos pocillos de las células se trataron bien con solo 2 μ M de oligómero Abeta, o con una combinación de oligómero Abeta 2 μ M y 50 μ g/ml de anticuerpo hC2 anti-Abeta.
- El oligómero Abeta se preparó disolviendo Abeta 1-42 (rPéptido) en HFIP, a partir del cual se tomaron alícuotas de péptidos Abeta en alícuotas de 10 μ l de 1 mg/ml y después se evaporaron en una campana extractora de humos durante 30 minutos y las películas de péptidos se almacenaron a -80°C hasta su uso. En el uso, la película de péptido se disolvió en 10 μ l de DMSO, después 78,6 μ l de HAMS F12, y la solución de péptido Abeta se incubó a 4°C durante 24-48 horas (25 μ M de concentración final de Abeta).
- Para las células de control, se añadió DMSO-F12 solo al mismo volumen que Abeta-DMSO en el día 5, y las células se cultivaron durante 4 días más sin ningún tratamiento adicional. En el día 9, las neuronas de todos los estados de cultivo fueron fijadas y teñidas con Tuj1 (un anticuerpo anti-beta-tubulina), seguido por tinción con anticuerpos secundarios marcados con FITC para visualizar los microtúbulos, y de ese modo los procesos neuronales en general. Los resultados se muestran en la Figura 20.
- Las neuronas corticales embrionarias de ratón no tratadas mostraron una morfología normal después de nueve días de cultivo (Figura 20, panel más a la izquierda). El tratamiento de las células con Oligómero Abeta durante tres días indujo la degeneración del axón y causó una disminución en el número total de los axones (Figura 20, parte inferior del panel central), y este efecto era incluso más pronunciado a los cuatro días de tratamiento (Figura 20, parte superior del panel central). Por el contrario, las células tratadas con la combinación de oligómero Abeta y anticuerpo hC2 anti-Abeta parecían similares a las células de control (Figura 20, paneles superior e inferior a la derecha). Estos resultados indican que el anticuerpo hC2 anti-Abeta era capaz de proteger a las neuronas corticales embrionarias de ratón de la degeneración inducida por el oligómero Abeta.

Tabla 4: Posiciones y cambios realizados en las regiones marco de cadena ligera C2 humanizada

Posición de cadena ligera	45	87	50	53
C2V _K de ratón	K	F	K	N
C2HuV _K 1 humanizada	Q	Y	K	N
C2HuV _K 2 humanizada	Q	F	K	N
C2HuV _K 3 humanizada	K	Y	K	N
C2HuV _K 4 humanizada	K	F	K	N
dpkl 5 de la línea germinal humana	Q	Y	L	N
C2V _K -R de ratón			R	
C2V _K -S de ratón				S

Tabla 5: Posiciones y cambios realizados en las regiones marco de cadena pesada C2 humanizada

Posición de cadena pesada	47	94
C2VHAF de ratón	L	S
C2HuVHAF1 humanizada	W	R
C2HuVHAF2 humanizada	W	S
C2HuVHAF3 humanizada	L	R
C2HuVHAF4 humanizada	L	S
DP-54 de línea germinal humana	W	R

Un total de 8 diferentes anticuerpos se construyeron con las cadenas ligeras humanizadas C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4 y las cadenas pesadas C2HuVHAF4 y C2HuVHAF2.

Tabla 6. Resumen de los péptidos utilizados en la segunda biblioteca

5 Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita.

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	Q	K	L	V	F	A
aa n.º	12	13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20

Tabla 7. Resumen de los péptidos utilizados en la tercera biblioteca.

10 Los aa que son importantes para la unión están marcados en cursiva y subrayados y los aa absolutamente críticos para la unión están marcados en cursiva y negrita

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A E
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A A
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A E D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A E A
aa n.º		13	14	<u>15</u>	16	17	<u>18</u>	19	20	21 22 <u>23</u>

Ejemplo 17 Efecto del anticuerpo hC2 sobre la apoptosis de células ganglionares de la retina cultivadas (RGC)

15 Para evaluar la capacidad *in vitro* del anticuerpo hC2 para reducir la muerte de células ganglionares de la retina (RGC) relacionada con enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con la anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como, por ejemplo, la degradación neuronal, se utilizaron cultivos RGC de ratas y ratones.

20 Para aislar las células, en el sacrificio, los animales son anestesiados, sus ojos son extraídos y la retina es diseccionada e incubada en solución de 2 mg/ml de papaína durante 25 minutos a 37 °C para descomponer la matriz extracelular. Al final del tratamiento, las células se lavan tres veces con medio RCG en presencia de un inhibidor de proteasa para detener la acción de la papaína. El tejido se tritura después pasándolo rápidamente hacia arriba y hacia abajo a través de una pipeta Pasteur hasta que las células se dispersan. Un contador Coulter comercialmente disponible se utiliza para determinar la densidad celular en la suspensión celular antes de cultivar las células en 95 % de aire/5 % de CO₂ a 37 °C.

5 Con el fin de imitar el daño de las enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como, por ejemplo, la degradación neuronal, y evaluar el efecto preventivo del anticuerpo hC2, las células se incubaron con L-glutamato durante tres días en presencia o ausencia del anticuerpo hC2. Las células cultivadas en tampón solo sirven como control.

10 Para determinar la supervivencia de las RGC, al final del período de incubación las células son fijadas con 3,7 % de formaldehído en solución salina de tampón fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 30 minutos, se enjuagaron tres veces en PBS y se incubaron durante 1 hora en PBS que contenía marcadores específicos de las RGC anticuerpo Thy1.1 o NF-L. El anticuerpo se elimina después mediante lavado y las células se incuban durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios, marcados para la fluorescencia, IgG anti-ratón de cabra, IgG anti-conejo de cabra o IgG anti-cabra de conejo. Al final de la incubación, las células se lavan, se tiñen durante 5 minutos con una solución de DAPI y se enjuagan. Las RGC supervivientes se cuentan por microscopía de fluorescencia y el número de células presentes después de la incubación con el anticuerpo hC2 se comparan con el control.

Ejemplo 18 Efecto del anticuerpo hC2 sobre la apoptosis *in vivo* de las células ganglionares de la retina (RGC)

15 Para evaluar la capacidad *in vivo* del anticuerpo hC2 para reducir la muerte de células ganglionares de la retina (CGR) en individuos afectados por enfermedades oculares asociadas con las anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como, por ejemplo, la degradación neuronal, se utilizan ratas y ratones para un estudio de presión intra-ocular (IOP) inducida de 2 a 16 semanas de duración. La muerte de las células ganglionares de la retina se mide al final del estudio tanto mediante formación de imágenes *in vivo* como mediante análisis de los resultados histológicos.

25 Con el fin de imitar el aumento de la presión intra-ocular asociado con algunas enfermedades oculares asociadas con anomalías patológicas/cambios en los tejidos del sistema visual, particularmente asociadas con las anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, tal como, por ejemplo, la degradación neuronal, en particular el glaucoma, los animales fueron primero anestesiados con ketamina intraperitoneal (75 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) y colirios de proparacaina tópica al 1 %. Después se utilizan dos procedimientos alternativos para elevar artificialmente la IOP en un ojo (unilateral) en las ratas y ratones. En el primer procedimiento, los animales anestesiados reciben una inyección de tinta china en la cámara anterior seguido por la fotocoagulación inducida con láser del colorante en la malla trabecular con un láser de diodo de 532 nm de la lámpara de rendija perpendicular a las trabéculas y paralela al iris. Los animales reciben un tratamiento inicial de 40 a 50 puntos de 50 μm de tamaño, 0,4 W, y una duración de 0,6 segundos. En el segundo procedimiento para aumentar artificialmente la IOP, los animales anestesiados reciben una inyección de 50 μl de solución salina hipertónica en las venas episclerales en un ojo utilizando una microaguja con una fuerza solo suficiente para que la vena se difumine.

35 Para medir la IOP, se utiliza un tonómetro de mano disponible comercialmente (TonoLab). Las mediciones se realizan mientras los animales están bajo la anestesia como la media de 12 lecturas inmediatamente antes del tratamiento con láser, 1, 4 y 7 días después del tratamiento, y después semanalmente durante la duración del experimento. Si, en un intervalo de una semana, la diferencia en la IOP entre los dos ojos de los animales es inferior a 799,93 Pa (6 mmHg), los animales no se incluyen posteriormente en el estudio.

40 Con el fin de evaluar el efecto preventivo del anticuerpo en hC2 en la apoptosis de RGC, la mitad de los animales que reciben el tratamiento de IOP inducida reciben una inyección intravítrea o intravenosa del anticuerpo hC2 en el momento de la elevación de la IOP. La mitad de los animales sirven como control. Las RGC funcionales en la retina completa de los ojos con elevación de la IOP son creadoras de imágenes y se cuentan, y después se comparan con el número presente en los ojos del lado contrario en los mismos animales. La diferencia en el número de RGC entre los dos ojos representan células que se han perdido como resultado de la elevación de la IOP en el ojo objeto de cirugía. El análisis de los cambios en este valor diferencial ayuda en la identificación de los efectos protectores provocados por el anticuerpo hC2.

50 El número de RGC se mide mediante el análisis de los resultados histológicos a las 2, 4, 8 y 16 semanas después de la elevación inducida de la IOP. Las retinas de los animales son fijadas en paraformaldehído al 4 % y se tiñen en secciones o en todo el montaje utilizando el marcador Brn3b específico de las RGC. Múltiples estudios han demostrado que la pérdida de tinción de Brn3b se correlaciona con la pérdida de función en las RGC. Para confirmar la exactitud del marcado histológico de las RGC, puede usarse este procedimiento junto con marcado en negro del nervio óptico del SCN con DiASP o Fluorogold en un subconjunto de animales para identificar las RGC que mantienen un axón intacto y funcional que no ha perdido la conectividad con las dianas en el cerebro.

55 Como un resultado secundario, también se mide la apoptosis de las RGC en un subconjunto de ojos. La anexina V marcada de forma fluorescente se utiliza para marcar las células apoptóticas mediante inyección intravítrea de la proteína una hora antes del sacrificio del animal. Las retinas se preparan como anteriormente y la formación de imágenes de la anexina V se lleva a cabo junto con la formación de imágenes de los resultados histológicos.

Lista de referencias

- Barghom S., Nimmrich V., Striebinger A., Krantz C., Keller P., Janson B., Bahr M., Schmidt M., Bitner R.S., Harlan J., Barlow E., Ebert U., Hillen H. (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- 5 Blond y Goldberg, 1987, PNAS, 1 de marzo, 1987 Vol. 84 | n.º 5 | 1147-1151
- Cox JPL, Tomlinson I.M. y Winter G. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line V_k segments reveals a strong bias in their usage.
- Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S., Foeller C. *Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, 1991.
- 10 Klein W.L. (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.
- Langdon S.D., Inaioki M., Kelsoe G. y Tedder T.F. *Immunogenetics* 2000; **51**: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution.
- 15 Mulligan R.C. y Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.
- Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G., *Nature* 1988; **332**: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.
- Schable K.F., Thiede R., Bensch A., Brensing-Kueppers J., Heim V., Kirschbaum T., Lamm R., Ohnrich M., Pourrajabi S., Roschenthaler F., Schwendinger J., Wichelhaus D., Zocher I. y Zachau H.G. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.
- 20 Tomlinson I.M., Walter G., Marks J.D., Llewelyn M.B. y Winter G. *J. Mol. Biol.* 1992; **227**: 776-798. The repertoire of human germline VH sequences reveals about 50 groups of VH segments with different hypervariable loops.

Listado de secuencias

<110> AC Immune
 <120> Anticuerpo humanizado
 <130> 089667-0156
 5 <141> 2008-10-03
 <150> US 60/960,617
 <151> 2007-10-05
 <160> 32
 <170> Patent In version 3.3
 10 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 15 <223> Región variable de la cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2 (CDR1)
 <400> 1
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2 (CDR2)
 <400> 2
 Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10
 15
 Gly
 25 <210> 3
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 30 <223> Región variable de la cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2 (CDR3)
 <400> 3
 Gly Asp Tyr
 1
 <210> 4
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2 (CDR1)
 <400> 4

ES 2 609 918 T3

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10
15
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2 (CDR2)
 <400> 5
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
 10 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 15 <223> Región variable de la cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2 (CDR3)
 <400> 6
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5
 <210> 7
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> epítipo A β , región 2
 <400> 7
Val Phe Phe Ala Glu Asp
 25 **1 5**
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> epítipo A β , región 1
 <400> 8
His Gln Lys Leu Val
1 5
 <210> 9
 35 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> carac_misc
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile
 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (4)..(4)
 45 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile
 <220>
 <221> carac_misc

<222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

 <220>
 <221> carac_misc
 5 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp

 <400> 9
 Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 10
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> carac_misc
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg

 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (2)..(2)
 20 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile
 25 <400> 10
 Xaa Xaa Lys Leu Xaa
 1 5

 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser His, Asn, Gln Lys, o Arg
 35 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Asn o Gln

 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, norleucina, Met, Phe, o Ile
 40 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Ala, Val, Leu, Ser o Ile
 45 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp
 50 <220>
 <221> carac_misc
 <222> (10)..(10)

ES 2 609 918 T3

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 12

5 <211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera variable HuVK 1 de C2 humanizado artificial

10 <400> 12

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10
 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75
 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90
 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de C2 humanizado artificial

<400> 13

ES 2 609 918 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10
 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75
 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90
 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155
 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170
 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 14

5 <211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región constante de la cadena ligera de C2 humanizado artificial constant region

10 <400> 14

ES 2 609 918 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10
 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75
 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90
 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

- <210> 15
- 5 <211> 112
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cadena pesada variable HuVH AF 4 de C2 humanizado artificial
- 10 <400> 15

ES 2 609 918 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10
 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75
 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90
 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

- 5 <210> 16
- <211> 439
- <212> PRT
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cadena pesada de C2 humanizado artificial
- 10 <400> 16

ES 2 609 918 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10
15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

ES 2 609 918 T3

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75
80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90
95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
115 120 125

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155
160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170
175

ES 2 609 918 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
180 185 190

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
210 215 220

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
225 230 235
240

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
245 250
255

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
260 265 270

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
290 295 300

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

ES 2 609 918 T3

305
320

310

315

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
325 330

335

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
340 345 350

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
355 360 365

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
370 375 380

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
385 390 395
400

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
405 410
415

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435

- 5 <210> 17
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223>REGIÓN DE CADENA C DE IG GAMMA-4 - modificada
- 10 <400> 17

ES 2 609 918 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10
15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 30
20 25

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75
80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90
95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

ES 2 609 918 T3

100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155
160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170
175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235
240

ES 2 609 918 T3

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250
255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315
320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 18
<211> 51
<212> DNA
5 <213> Mus musculus

<220>
<223> Región variable de la cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2 (CDR2)

<400> 18
agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaaggg c
51

10 <210> 19
<211> 9
<212> DNA
<213> Mus musculus

15 <220>
<223> Región variable de la cadena pesada humanizada HuVH AF 4 de C2 (CDR3)

<400> 19
ggtgactac
9

20 <210> 20
<211> 49
<212> DNA
<213> Mus musculus

ES 2 609 918 T3

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera humanizada HuVK 1 de C2 (CDR1)

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt

49

5 <210> 21

<211> 635

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> cadena ligera variable Hu VK 1 de C2 humanizado artificial

<400> 21

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctcgttga gctcgcctcc

60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg

120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt

180

tctggggctcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc

240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttctc

300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaa

336

<210> 22

<211> 657

15 <212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena ligera de C2 humanizado artificial

<400> 22

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctctcgttga gctcgcctcc

20 60

ES 2 609 918 T3

atctcttgca gatctagtca ggccttgta tatagtaatg gagacaceta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt
180

tctgggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct
300

tggacgttcg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgct
360

ttcatcttc cgcctctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg
420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa
480

tgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc
540

agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagteta cgctgcgaa
600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt
657

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> región constante de la cadena ligera de C2 humanizado artificial

<400> 23

ES 2 609 918 T3

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat ctgatgagca gttgaaatct
60

ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagge caaagtacag
120

tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac
180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag
240

aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag
300

agcttcaaca ggggagagtg t
321

<210> 24

<211> 798

<212> DNA

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada variable Hu VH AF de C2 humanizado artificial

<400> 24

gagggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct
120

ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac
240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac
300

tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca
336

10 <210> 25

<211> 1317

<212> DNA

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cadena pesada de C2 humanizado artificial

<400> 25

ES 2 609 918 T3

gaggtgcagc tggtcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgagactc
60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct
120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat
180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac
240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac
300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc
360
ttccccctgg cgccctgctc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg
420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc
480
ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg
540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag
600
cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtccccca
660
tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaaccaag
720
gacactctca tgatctcccg gaccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag
780
gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggagggtgca taatgccaaag
840
acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc
900
ctgcaccagg actggtgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc
960
cgtctctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg
1020
tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg
1080
gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag
1140
aacaactaca agaccacgcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc
1200
aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg
1260
catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa
1317

- <210> 26
- 5 <211> 981
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

ES 2 609 918 T3

<220>

<223> región constante de la cadena pesada de C2 humanizado artificial

<400> 26

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag
60

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg
120

tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca
180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc
240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc
300

aaatatggtc ccccggtgct cccatgcccc gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc
360

ttctgttcc ccccaaaacc caaggacct ctcattgatct cccggacccc tgaggtcacg
420

tgctgtggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat
480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac
540

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag
600

tgcaaggctt ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa
660

5

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag
720

aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag
780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc
840

gacggtcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg
900

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc
960

ctctccctgt ctctgggtaa a
981

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 27

ES 2 609 918 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10
 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser 30
 20 25

Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser 45
 35 40

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro 60
 50 55

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile 75
 65 70 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser 90
 85 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 110
 100 105

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 28

ES 2 609 918 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10
 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Asn Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75
 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90
 95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

5 <213> Mus musculus

<400> 29

ES 2 609 918 T3

gatgttgga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc
60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta tttacattgg
120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccgattt
180

tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc
240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcc
300

tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa
336

<210> 30

<211> 417

<212> DNA

5 <213> Mus musculus

<400> 30

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttcttc cagcagtgat
60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc
120

tcttgcagat ctagtccagag ccttgtatat agtaatggag acacctattt acattggtac
180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa cegattttct
240

ggggccccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc
300

agagtggagg ctgaggatct gggagtatat ttctgctctc aaagtacaca tgttccttgg
360

acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta
417

10 <210> 31

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 31

ES 2 609 918 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact
120

ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat
180

ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa cacctgtac
240

ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac
300

tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca
336

- 5 <210> 32
- <211> 408
- <212> DNA
- <213> Mus musculus

<400> 32
atgrasttsg ggytcagmtt grttttcett gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag
60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc
120

tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatggcatgt ctggggttgc ccagactcca
180

gacaagaggc tggaattggt cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca
240

gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg
300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac
360

tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc
408

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto en la proteína beta-amiloide, en donde el anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos RVSNRFS, o la secuencia de aminoácidos KVSSRFS; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y (b) una región Fc de la IgG1 con reducida unión al Fc.gamma.R que tiene una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 378, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc de la IgG1.
2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo comprende una mutación D285A en la región Fc.
3. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1 o 2 en el tratamiento de glaucoma.
4. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 3, en donde el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario y glaucoma exfoliativo.
5. Un anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo, que reconoce y se une a al menos un sitio distinto en la proteína beta-amiloide y comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4; una CDR2 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos RVSNRFS, o la secuencia de aminoácidos KVSSRFS; y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y (b) una región Fc de IgG1 con reducida unión al Fc.gamma.R que tiene una modificación de aminoácidos en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc de la IgG1, para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular.
6. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) la distrofia reticular según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo comprende una mutación D265A en la región Fc.
7. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según las reivindicaciones 5 o 6 por disminución de la carga de la placa o de la cantidad de placas en la capa de células ganglionares de la retina,
8. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según las reivindicaciones 5 o 6 por disminución de la cantidad total de amiloide- β soluble en la capa de células ganglionares de la retina.
9. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado

- de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según las reivindicaciones 5 o 6 para la prevención, tratamiento o alivio de los efectos de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular y/o distrofia reticular.
- 5
10. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según las reivindicaciones 5 o 6 al mantener o disminuir la presión ocular en los ojos de un animal que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular y/o distrofia reticular.
- 10
11. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde el anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo comprende la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 15.
- 15
12. El anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 en el tratamiento de glaucoma,
- 20
13. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo para uso en el tratamiento del glaucoma según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde el glaucoma se selecciona del grupo que consiste en glaucoma crónico de ángulo abierto (COAG), glaucoma agudo de ángulo cerrado (AACG), glaucoma de mecanismo mixto o combinado, glaucoma de tensión normal, glaucoma congénito, glaucoma secundario y glaucoma exfoliativo.
- 25
14. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo comprende la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 y la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15.
- 30
15. El anticuerpo humanizado o una parte funcional del mismo, o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en los tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) ocular amiloidosis caracterizado por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el sujeto es un mamífero.
- 35
16. El anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo, o la composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular según la reivindicación 15, en donde el mamífero es un ser humano.
- 40
17. Uso de un anticuerpo humanizado o parte funcional del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un sujeto que está aquejado de una enfermedad ocular asociada con anomalías patológicas/cambios relacionados con la beta-amiloide en tejidos del sistema visual, seleccionados de (i) glaucoma, (ii) neuritis óptica, (iii) amiloidosis ocular caracterizada por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías papilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario, y (iv) distrofia reticular
- 45
- 50
- 55
- i) reduciendo la carga de la placa en la capa de células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
 - ii) reduciendo la cantidad de placas en la capa de células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
 - iii) disminuyendo la cantidad total de β -amiloide soluble en la capa de células ganglionares de la retina de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular;
 - iv) previniendo, tratando o aliviando los efectos de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia

reticular; o

- v) manteniendo o disminuyendo la presión ocular en los ojos de un sujeto que está aquejado de glaucoma, neuritis óptica, amiloidosis ocular o distrofia reticular,

5 en donde la amiloidosis ocular se caracteriza por vasos conjuntivales anómalos, queratoconjuntivitis seca, anomalías pupilares, opacidades del vítreo y/o glaucoma secundario.

18. El uso de la reivindicación 17, en donde el sujeto es un mamífero,

19. El uso de la reivindicación 18, en donde el sujeto es un ser humano.

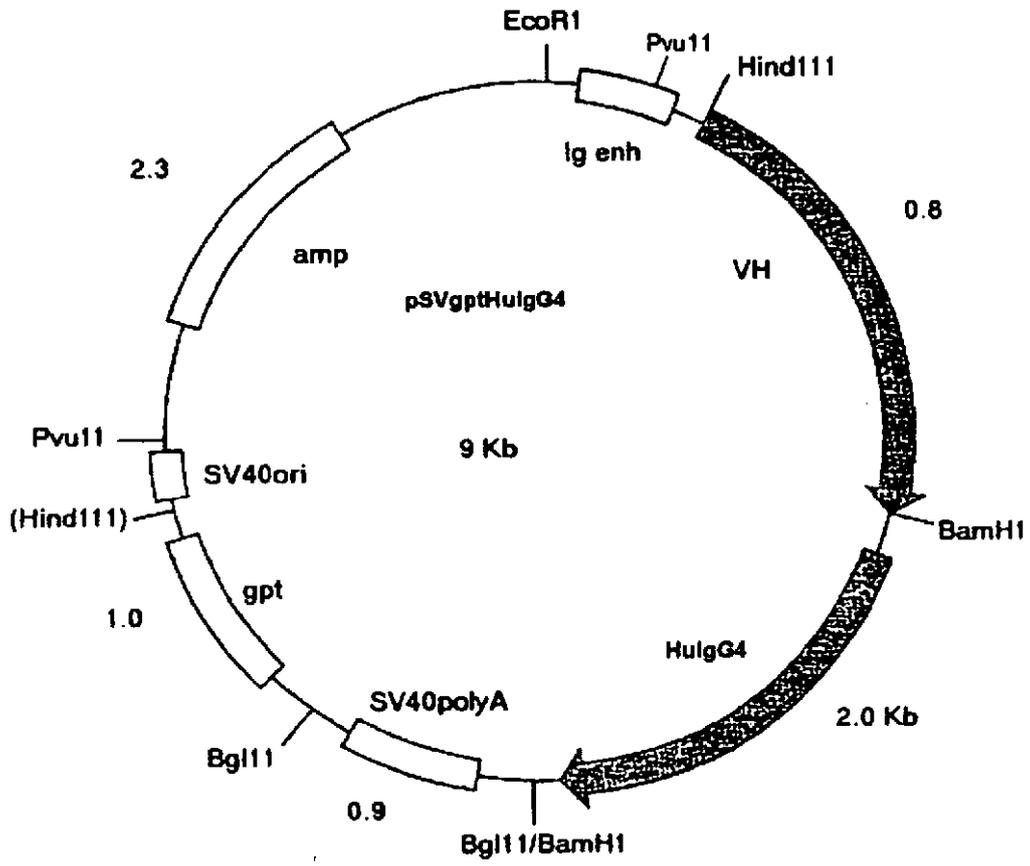


FIG 1

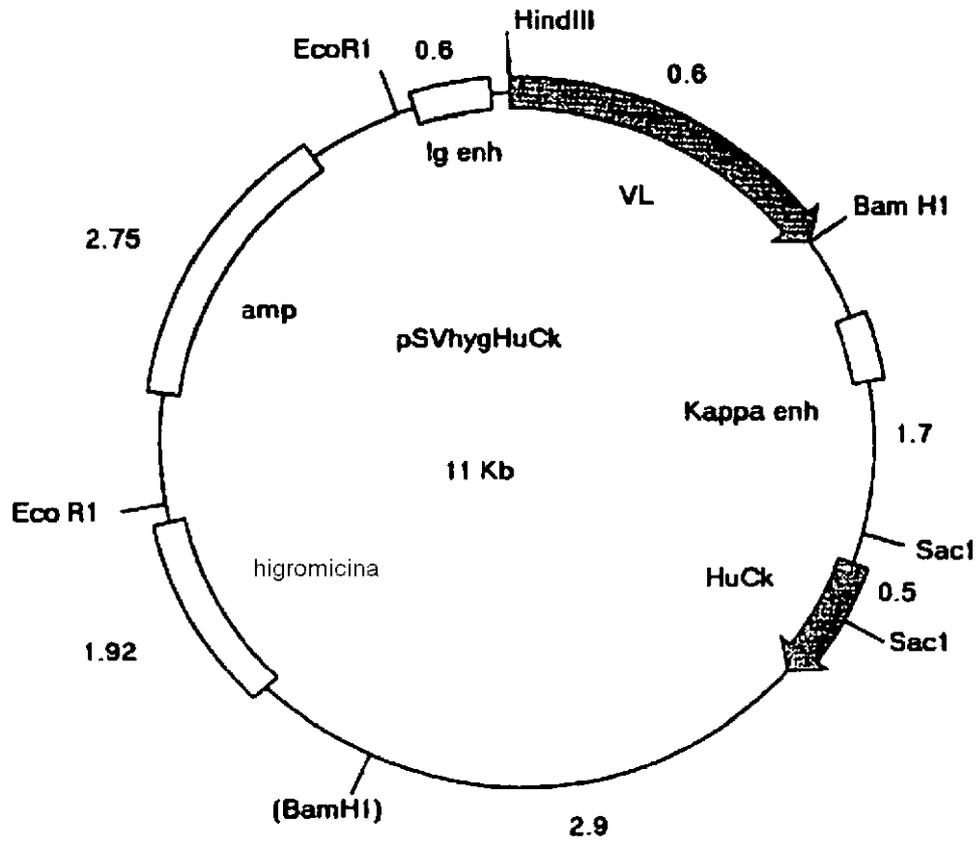


FIG 2

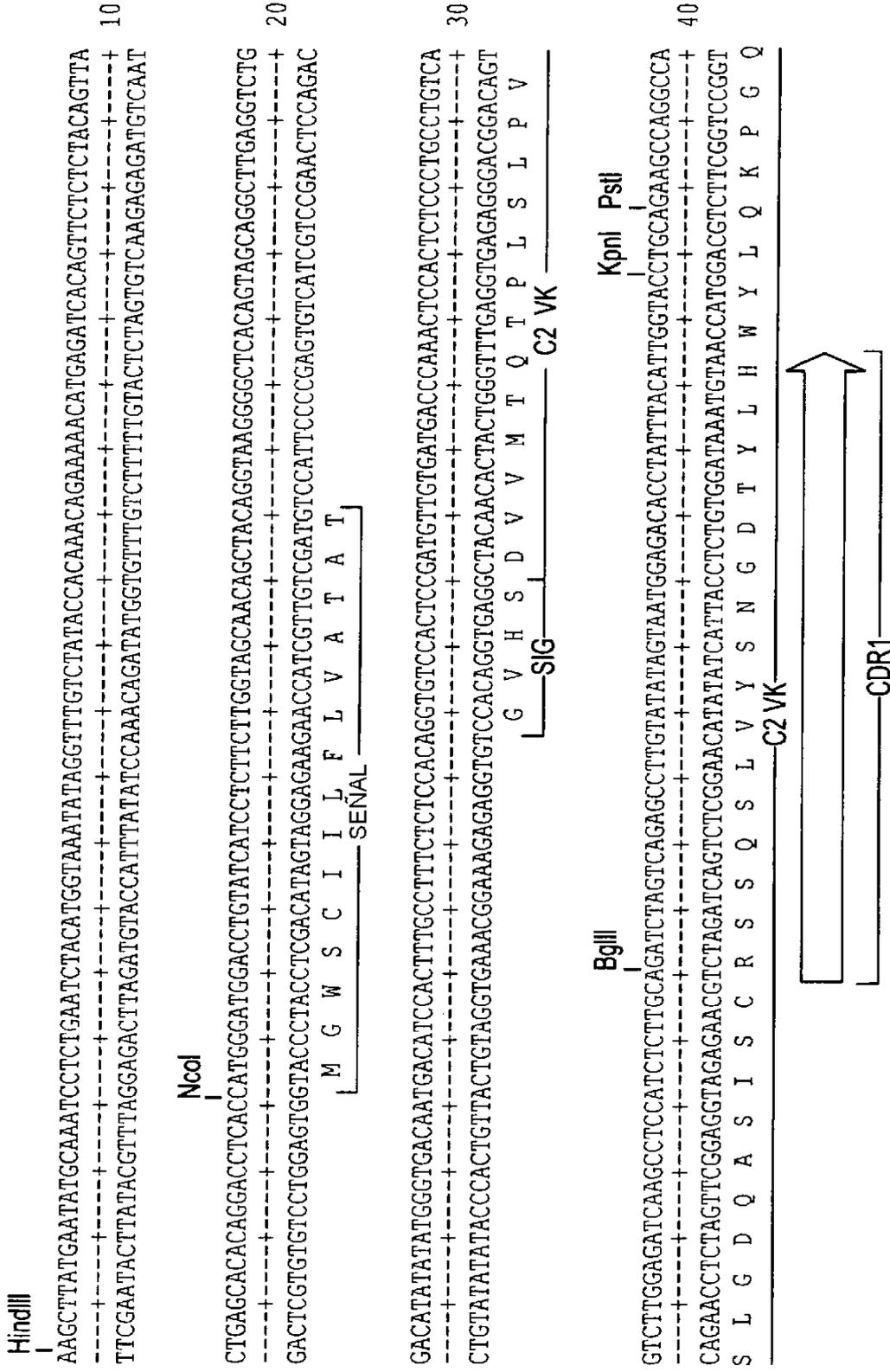


FIG. 3-1

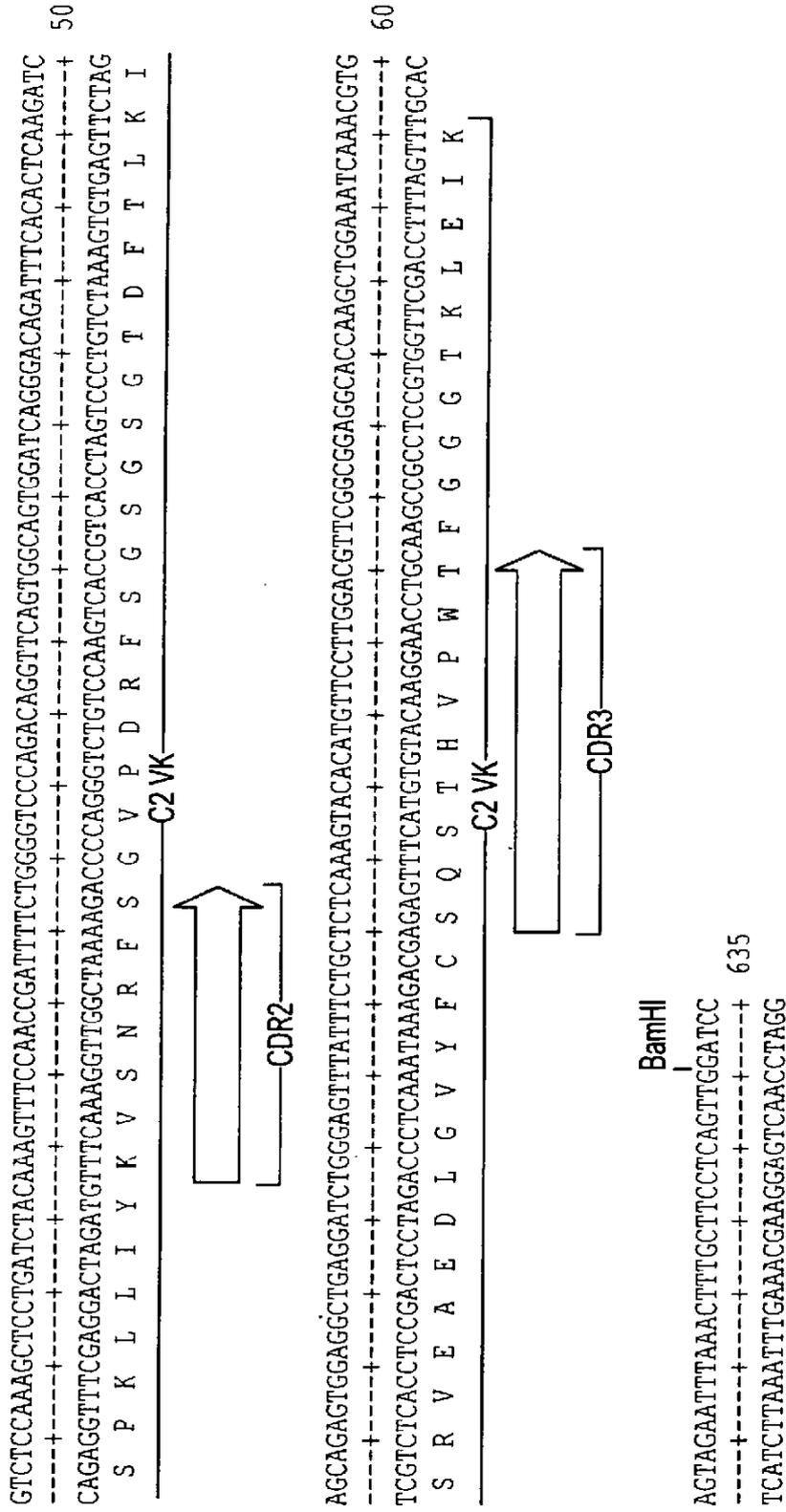


FIG. 3-2

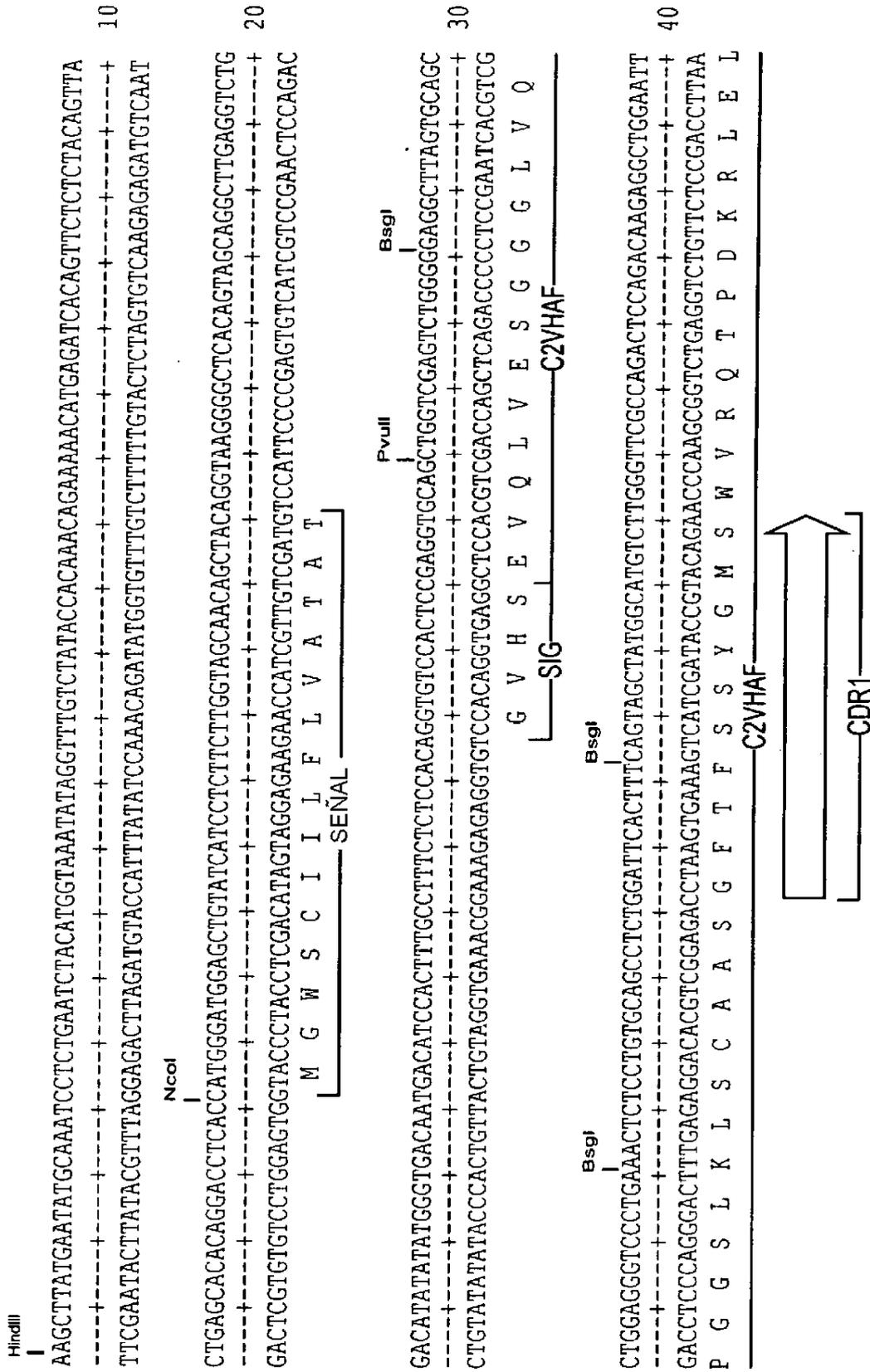


FIG. 4-1

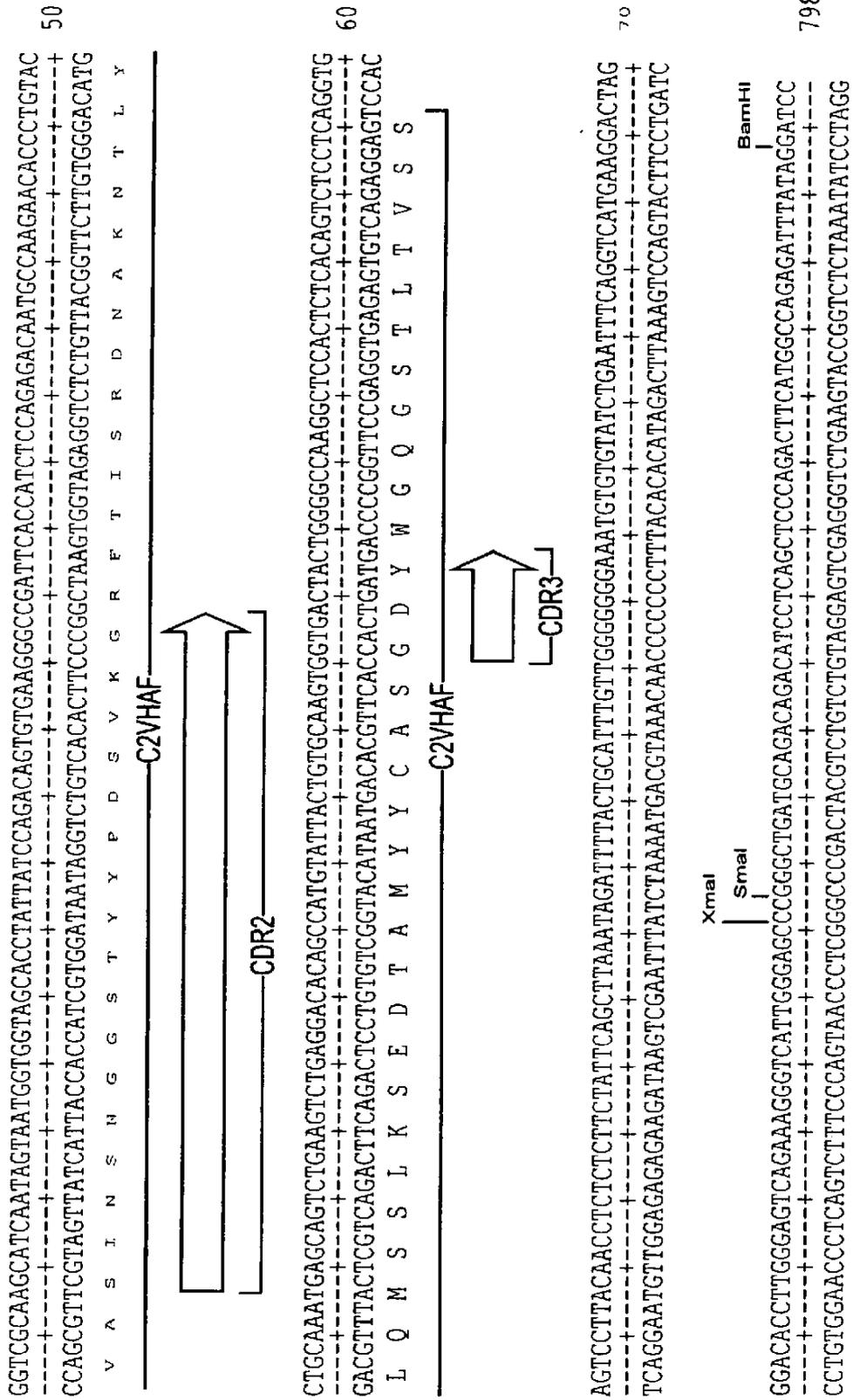


FIG. 4-2

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S		
AF120466	E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F T F S		
	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
AF120466	S Y G M S W V R Q T P D K R L E W V A T I S S G S Y T Y Y		
	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
AF120466	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
	100	110	
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S		
AF120466	T A M Y Y C A R R		

FIG 5

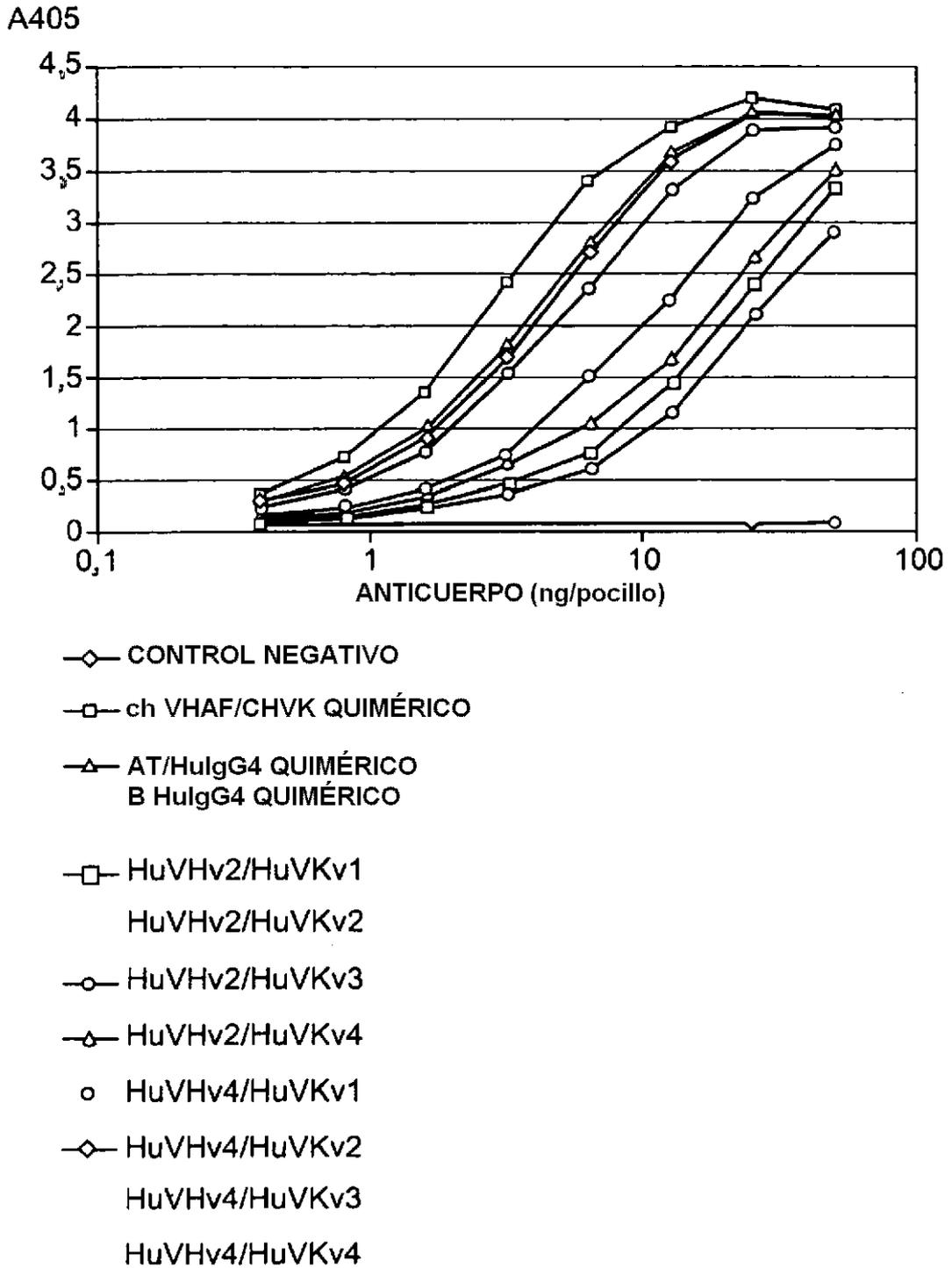


FIG. 6

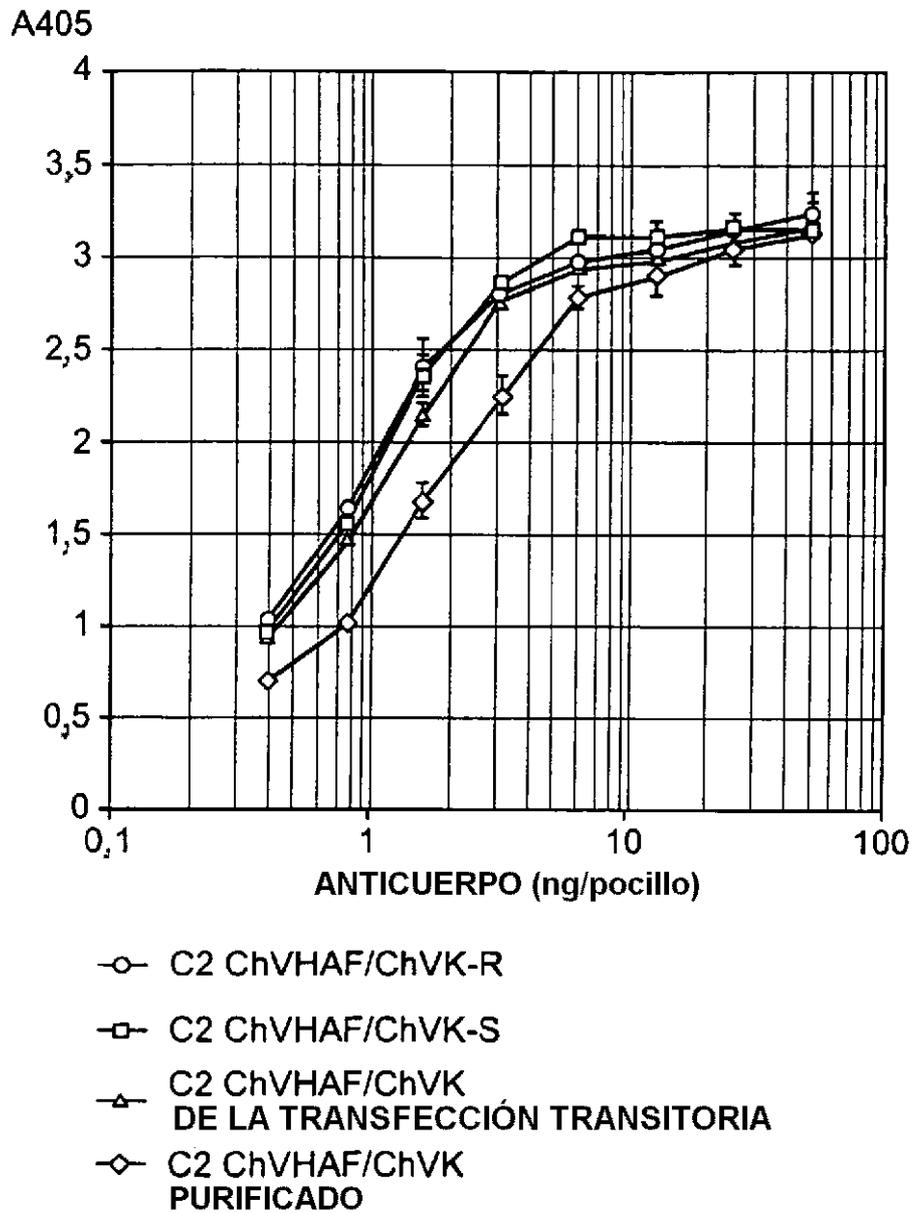


FIG. 7

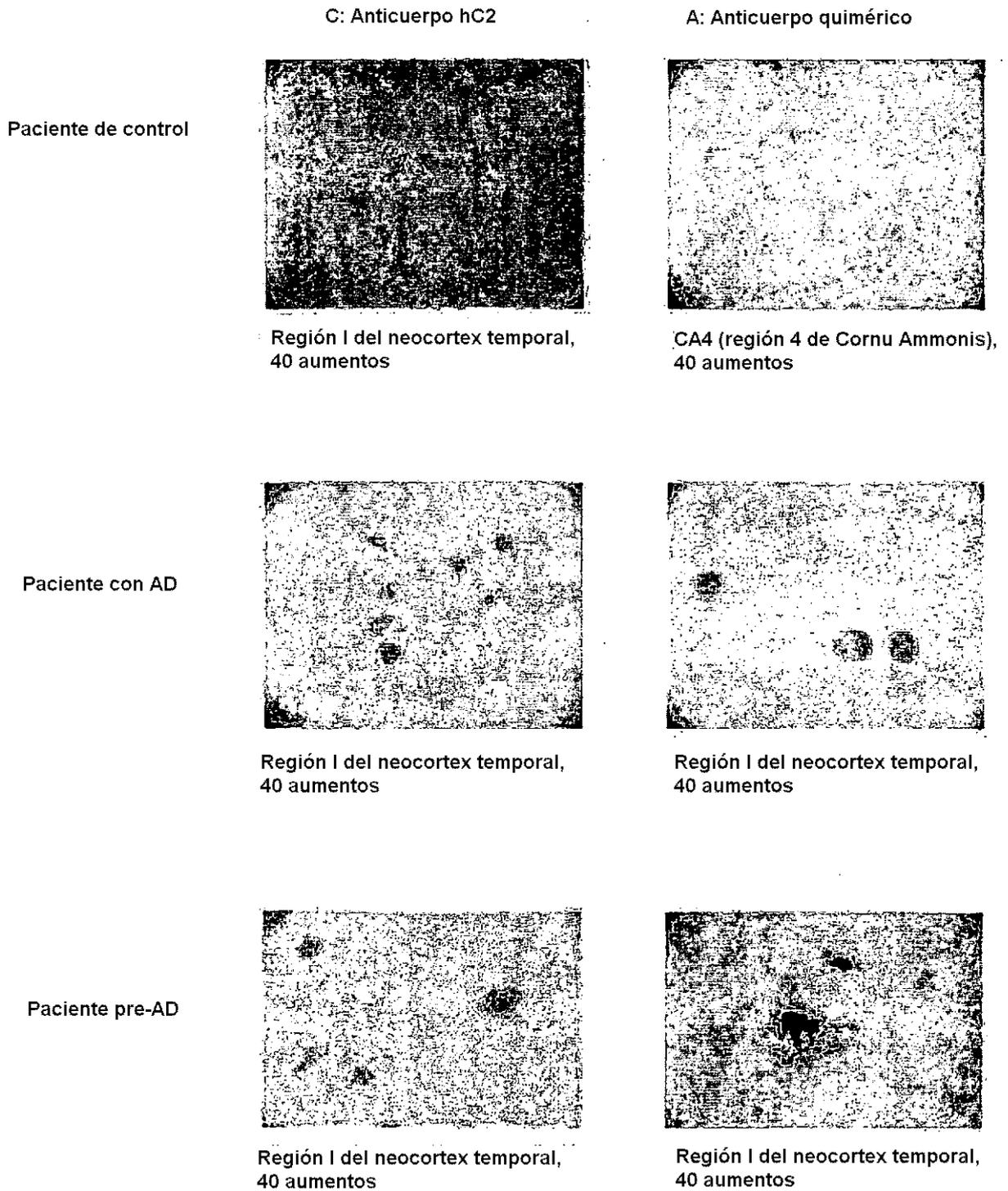


FIG. 8

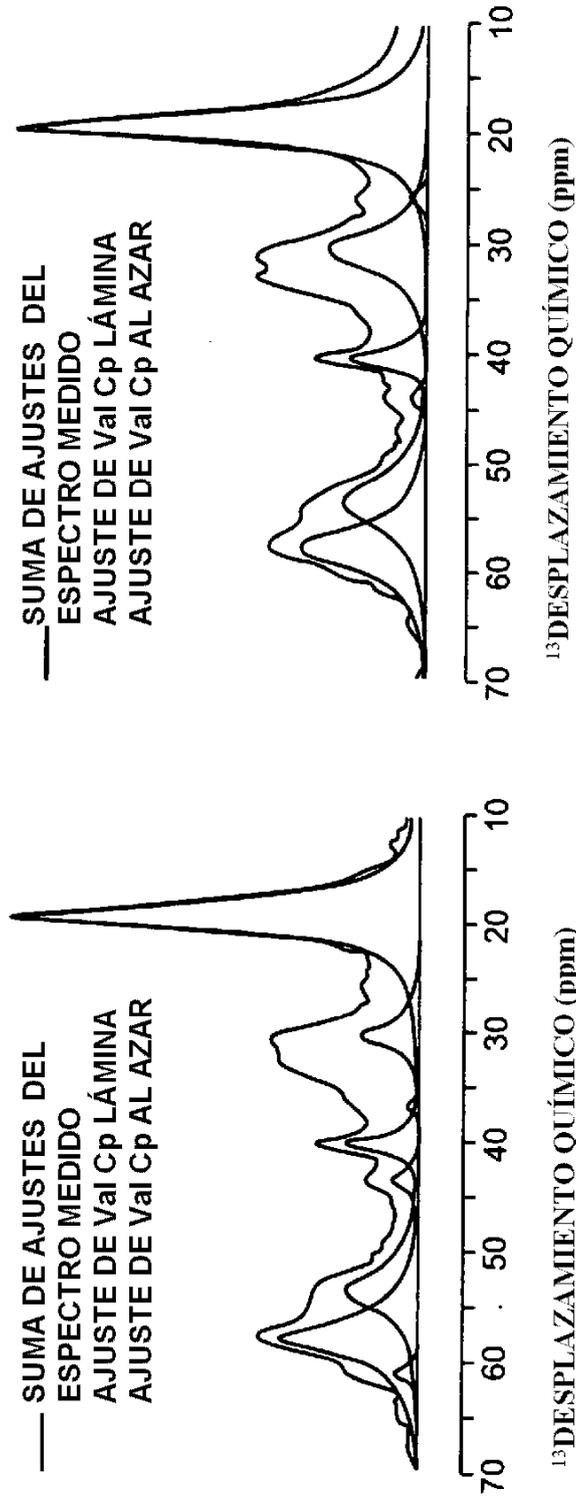


FIG. 9A

RESONANCIA	PBS		C2 DE RATÓN	
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)
Val CB - LÁMINA	32,60	479	33,09	366
Val CB - AL AZAR	30,27	200	30,27	340
		% DE INTENSIDAD INTEGRAL		% DE INTENSIDAD INTEGRAL
		81,7		53,5
		18,3		46,5

FIG. 9B

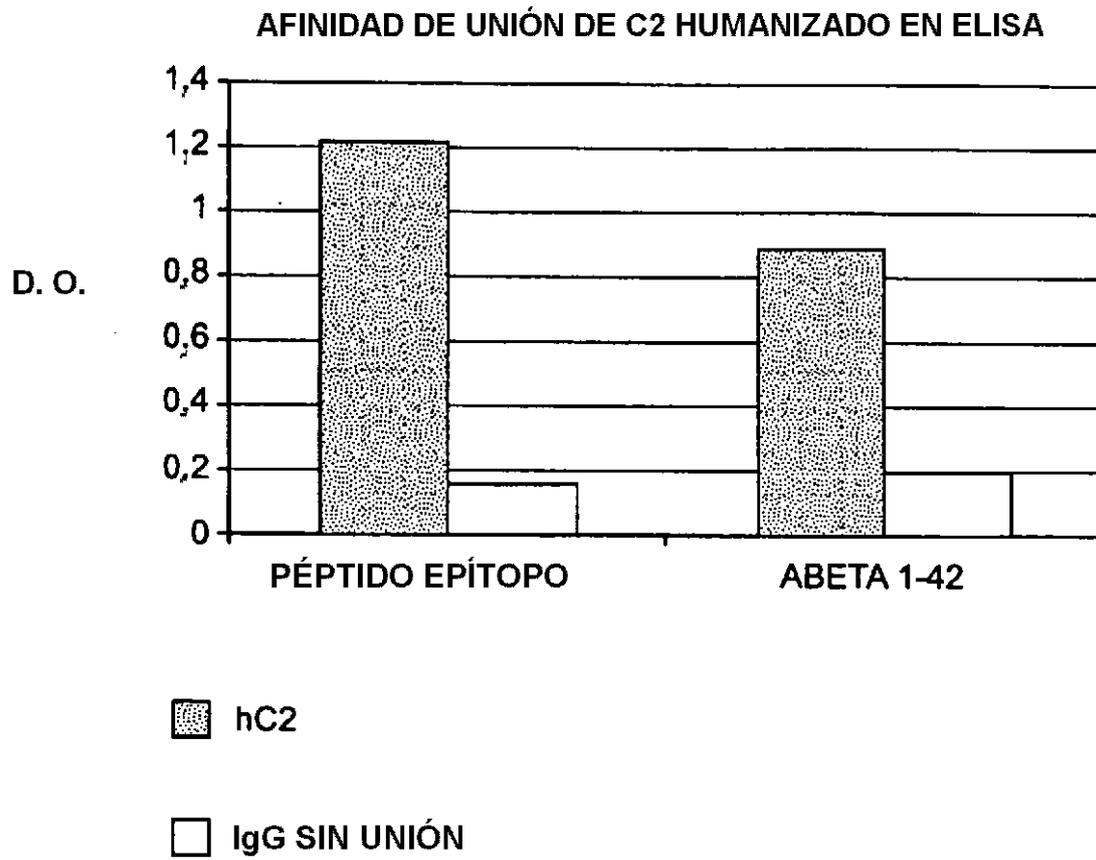


FIG. 10

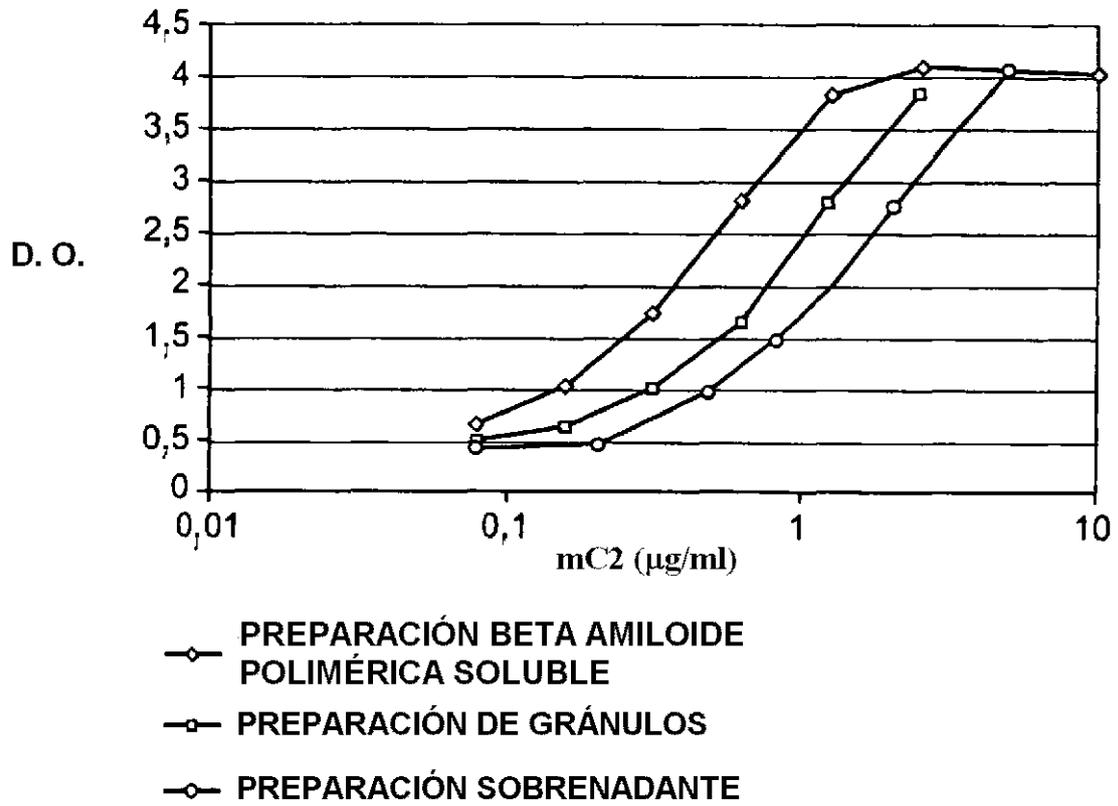


FIG. 11

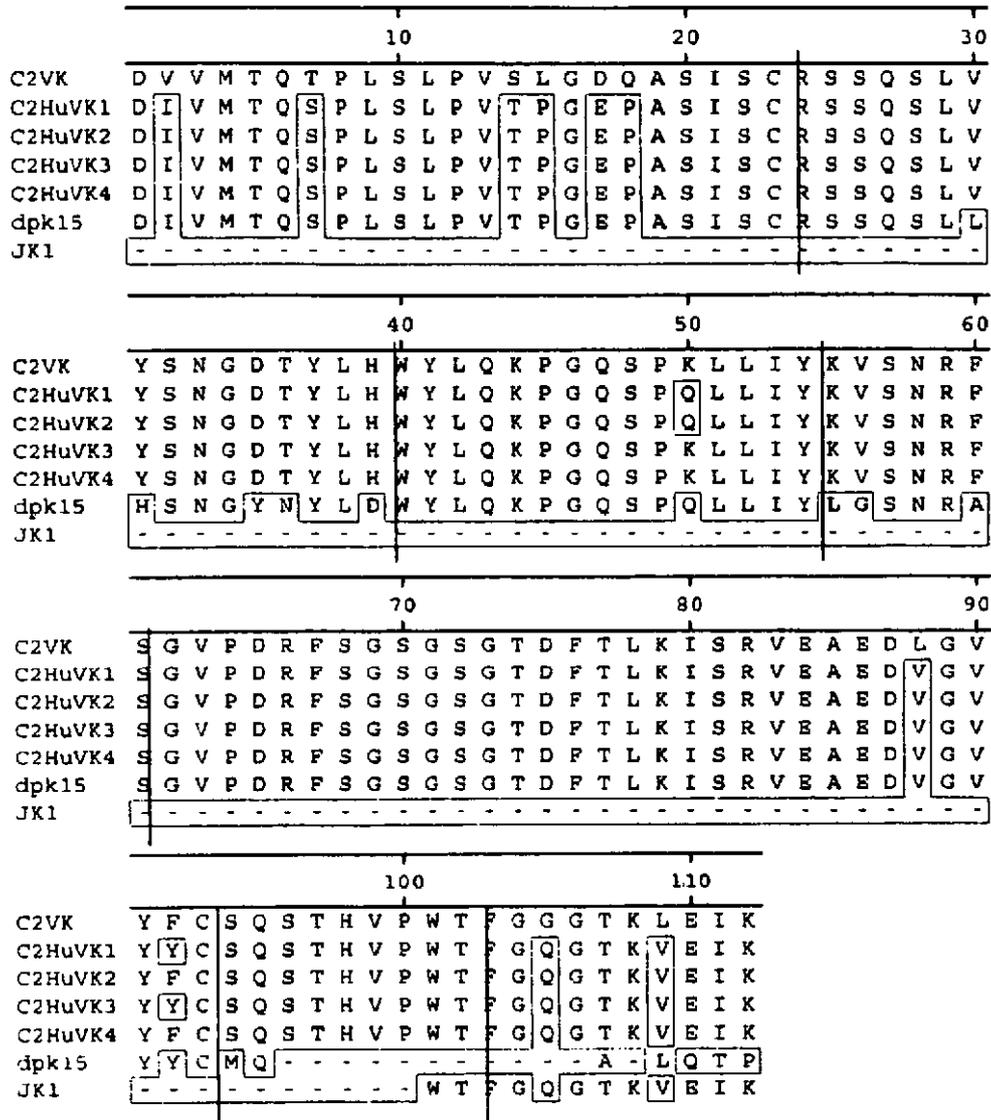


FIG 12.

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K	L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R	L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R	L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R	L S C A A S	G F T F S
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R	L S C A A S	G F T F S
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R	L S C A A S	G F T F S
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S	I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S	I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S	I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S	I N S N G G S T Y Y	
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S	I N S N G G S T Y Y	
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I	K Q D G S E K Y Y	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - - Y Y

	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S	
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
DP-54	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S	

FIG 13.

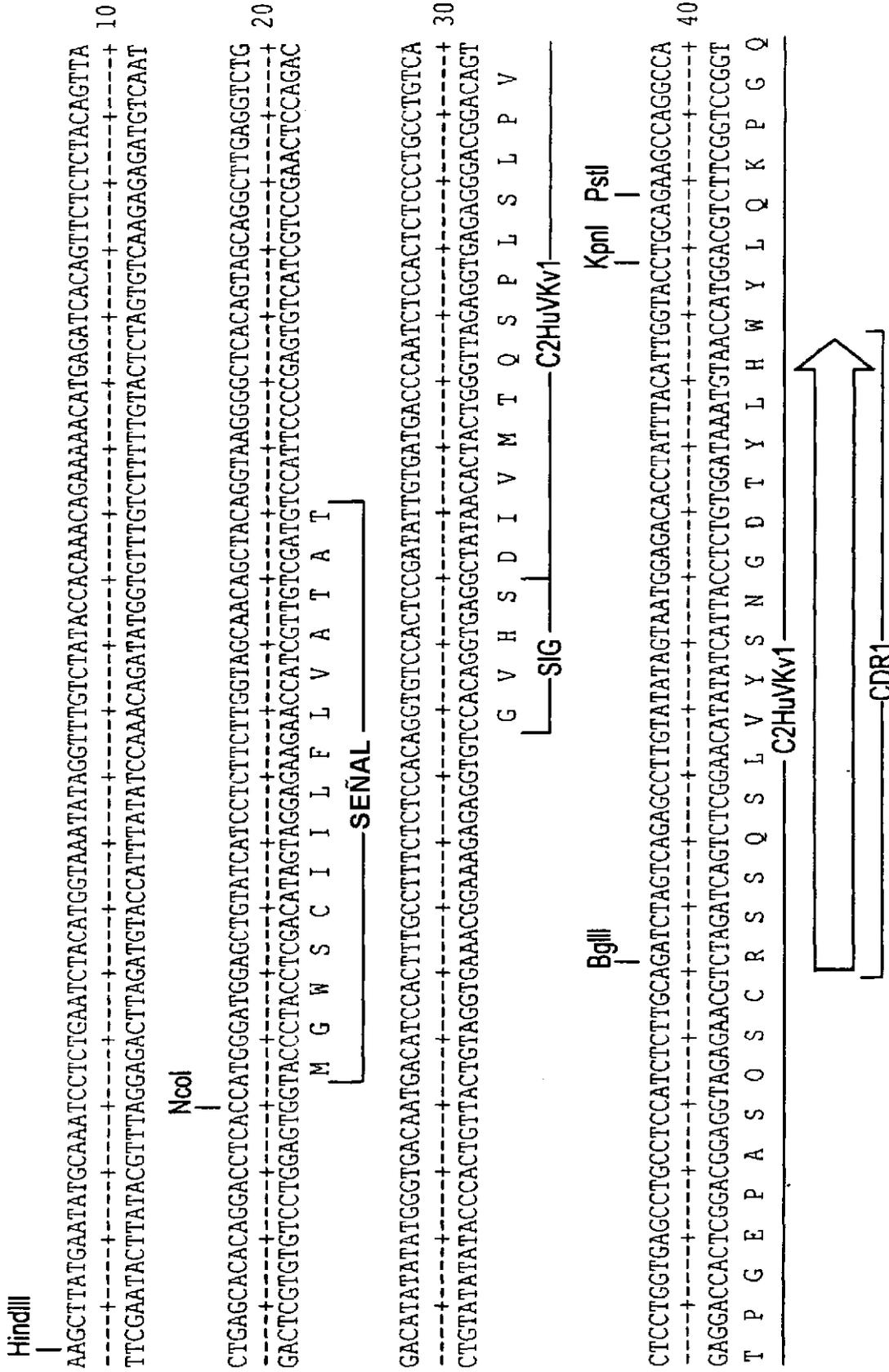


FIG. 14-1

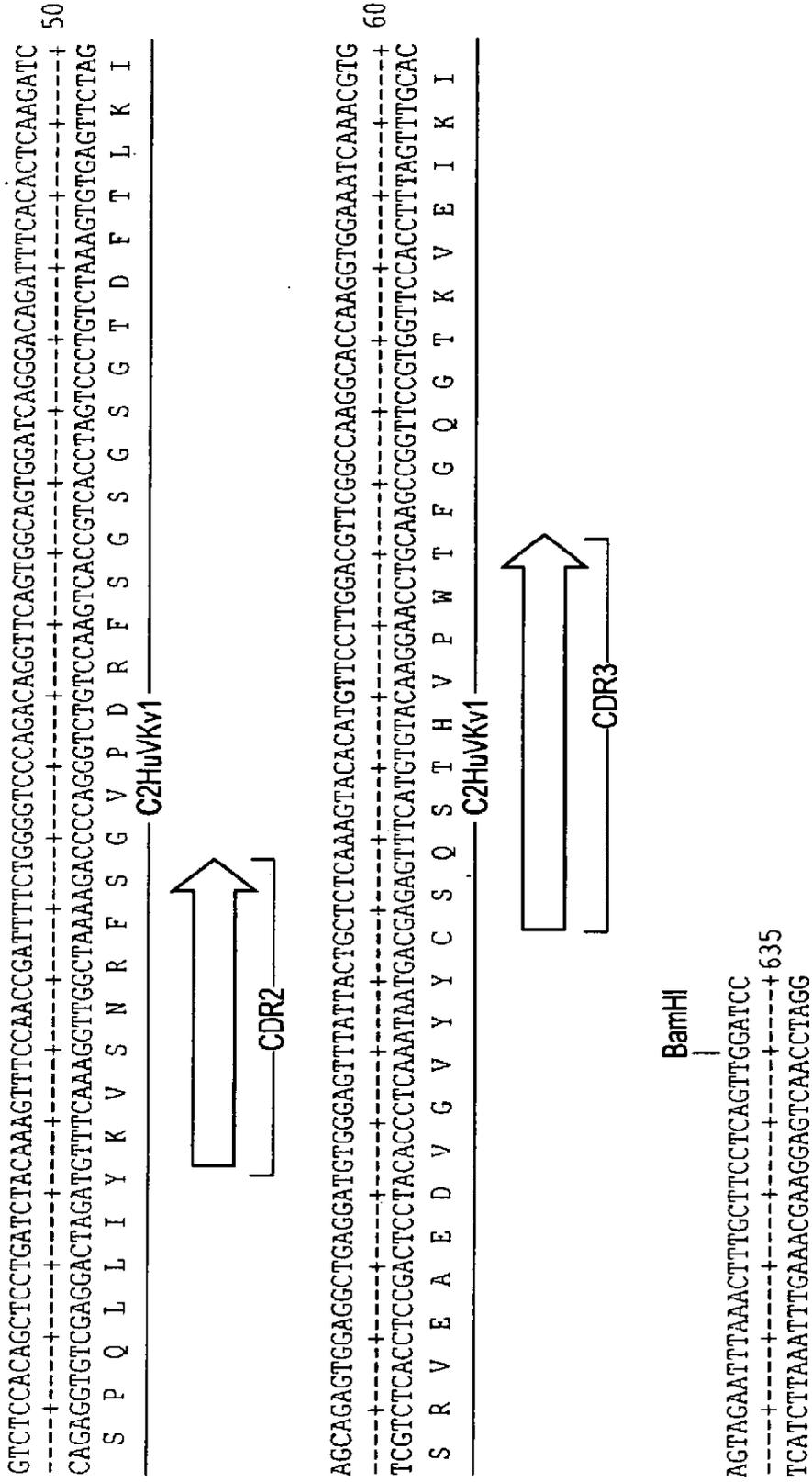


FIG. 14-2

BamHI | BglII

GGATCCTGCCAGAGTCTCACAGATGCTTCTGAGACAACATTTGCTTTCAAAAATGAACCACACACATCCTAAAGATCTCAGCCACTCCCATGTTTCAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 100

CCTAGGACCGTCTCAGAGTGTCTACGAGACTCTGTTGTAACGAAAGTTTTTACTTGGTGTGTAGGATTTCTAGAGTCGGTGAAGGGTACAAAGTA

TTTATGTTACAGCAAAACATCACAAACATCAATCTCTACAGATCACCACTGCATGTGATCAATAAAAAATAGTTTTTGCAACAATGGTACTTTATGATAATCATC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 200

AAATACAAATGTCGTTGTAGTGTGTTAGTAAGGATGCTAGTGGTGACGTACACTAGTTATTTATCAAAAAACGTTGTTACCATGAATACTATTAGTAG

TTTTATGTTTACAAAATCTGCTTACAAATAGTTATTCGGTTGCACGTTCATATTAGATTCCAAATAGCTCACTTAGGAACAATAAGTCCCTCGAACAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300

AAAAATAACAATAATGTTTATGACGAAATGTTATCAATAAGCCAACCGTGACAAGTATAATCTAAAGGTTAATCGAGTGAATCCTTGTAATTCAGGGAGCTGTGC

CTCAGTCACTTTTTCATTCCTGTTCTATCCCCCTACATCTCTTCCCTTGCAGACGACTATCTCCTACACTGAAACAGGAAAGCTAGCTTTTTTTTTTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 400

GAGTCAGTAGAAAAAGTAAGGACAAGATAGGGGATGTAGAGAAAGGAAACGCTCTGCTGATAGAGATGTGACTTTTGCTTTCCGATCGAAAAAAAAG

AGTGCATTTAAATTTCAATAATCCTCTCATCAATGTATTTAAATAACAANAAGCTCAACCAAAAAGAAAGAAATATGTAATTCCTTCAGAGTAAAAAT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 500

TCACGAPAAATTAATAAAGTTATAGGAGAGTAGTTTACATAAATTTATTGTTTTCGAGTTGGTTTTCTTTTATACATTAAGAAAGTCTCAATTTTTA

CACACCCATGACCTGGCCACTGAGGGCTTGATCAATTCACTTTGAAATTTGGCATTAAATACCAATTAAGGTATATTAAGTTTAAAAATAAGATAATTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600

GTGTGGTACTCGACCCGGTACTCCCGAACTAGTTAAGTGAACCTAAACCGTAATTTATGGTAAATCCATATAAATGACTAAAAATTTTTATTCTATATAA

CGTGACCATGTTTTAACTTTCAAAAATGTAGCTGCCAGTGTGATTTTATTTTCAGTTGTACAAAATACTAAACCTATAGCAATGTGATTAATFAAAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 700

GCCTGGTACAAAAAATGAAAGTTTTTACATCGACCGGTCACACACTAAAAATAAAGTCAACATGTTTTATAGATTTGGATATCGTTACACTAATTTATTTTT

FIG. 15-1

```

CTTAAACATAATTTCCAGTACCTTAAATCTGTGATAGGAAAATTTTAAATCTGAGTATTTTAAATTCATAAATCTCTAAAATAGTTTAATGATTTGTCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAATTTGTATAAAAAGTCATGGAATTAAGACACTATCCCTTTAAAAATTAGACTCATAAAAATTAAGTATTAGAGATTTTATCAAAATTTACTTAAACACGTAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                PvuII
TGTTGCTGTCGTTTACCCAGCTGATCTCAAAGTGATATTTAAGGAGATATTTGGTCTGCAACAACCTTGATAGGACTATTTTAGGGCCITTTTAAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAACGACAGCAAAATGGGGTCGACTAGAGTTTTCACCTATAAAATTCCTCTAATAAAAACCAGACGGTTGTTGAACTATCCTGATAAAAATCCCGGAAAATTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCTATTAAAACCTAACTTACAACGATTCAAAACCTGTTTAAAACCTATTTCAAATGATTTTAGAGCCTTTTGAAAACCTCTTTTAAAACACTTTTTTAAAACCTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGATAATTTTGATGTGAATGTGCTAAGTTTTCACAAAATTTTGACAAAATTTTACTAAAATCTCGGAAAACCTTTTGAGAAAATTTTGAGAAAATTTTGAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                EcoRI
ATTAAAACCTAAAGATAACTTGAAAATAATTTTCATGTCAAAATACATTAACCTGTTTAAATGCCAGATGAAAAATGTAAAAGCTATCAAGAATTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATTTTGATTAATCTATGAACTTTATAAAAGTACAGTTTATGTAATTCACAAAATTTACGGTCTACTTTTTTACATTTTCGATAGTTCTTTAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                NcoI
ACCCAGATAGGAGTACTTCATAGCATGTTTTCCCTGCTTATTTCCAGTCGATCACATTAATTTGCTACCATGGTTATTTTATACAATTAATCTGAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGGCTATCCCTCATAGMAGTATCGTACAAAAAGGGACCGAATAAAAGGTCAC TAGTGTATAAAAACGATGGTACCAATAAAAATATGTTAATAGACTTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTAGTTATGAAGATTAAGAGAGAGAAAATATAAACATAAGAGATTCAGTCCTTTCATGTTGAACCTGGTTAACAGTGAAGTTAGTTTTAAAAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAATCAAATACTCTAAATTTCTCTTTTATAATTTTGATTTCTAAGTCAGAAAGTACAACCTGACGACCAATTTGTCACITCAATCAAAAATTTTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                PvuII
AAAAAAAATAATTTCTGTTATCAGCTGACTTCTCCCTATCTGTTGACTTCTCCAGCAAAAAGATTCCTATTTTACATTTTAACTACTGCTCCCCACCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTTTTTGATAAAGACAAATAGTCGACTGAAGAGGGATAGACAACCTGAAGAGGGTCTGTTTCTAAGAATAAAAATGTAATAATTTGATGACGAGAGGGTGGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```

FIG. 15-2

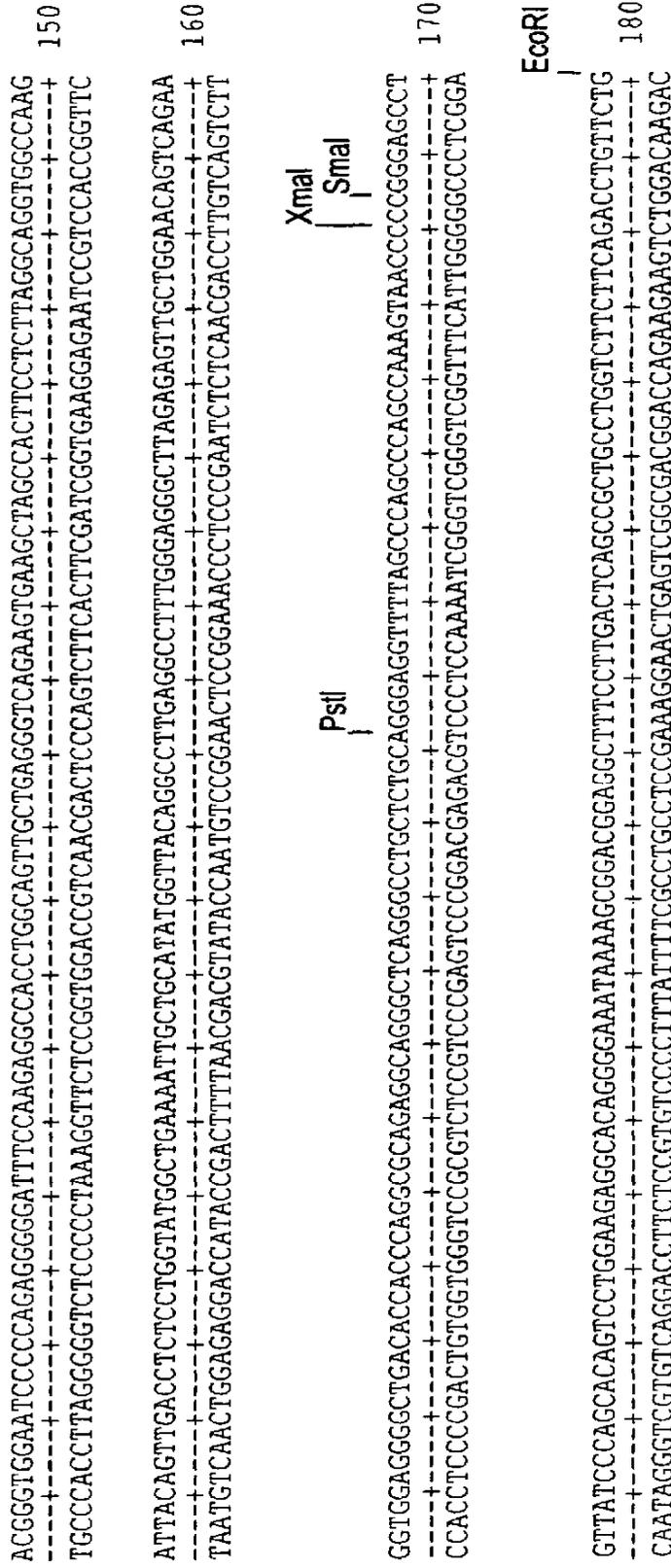


FIG. 15-3

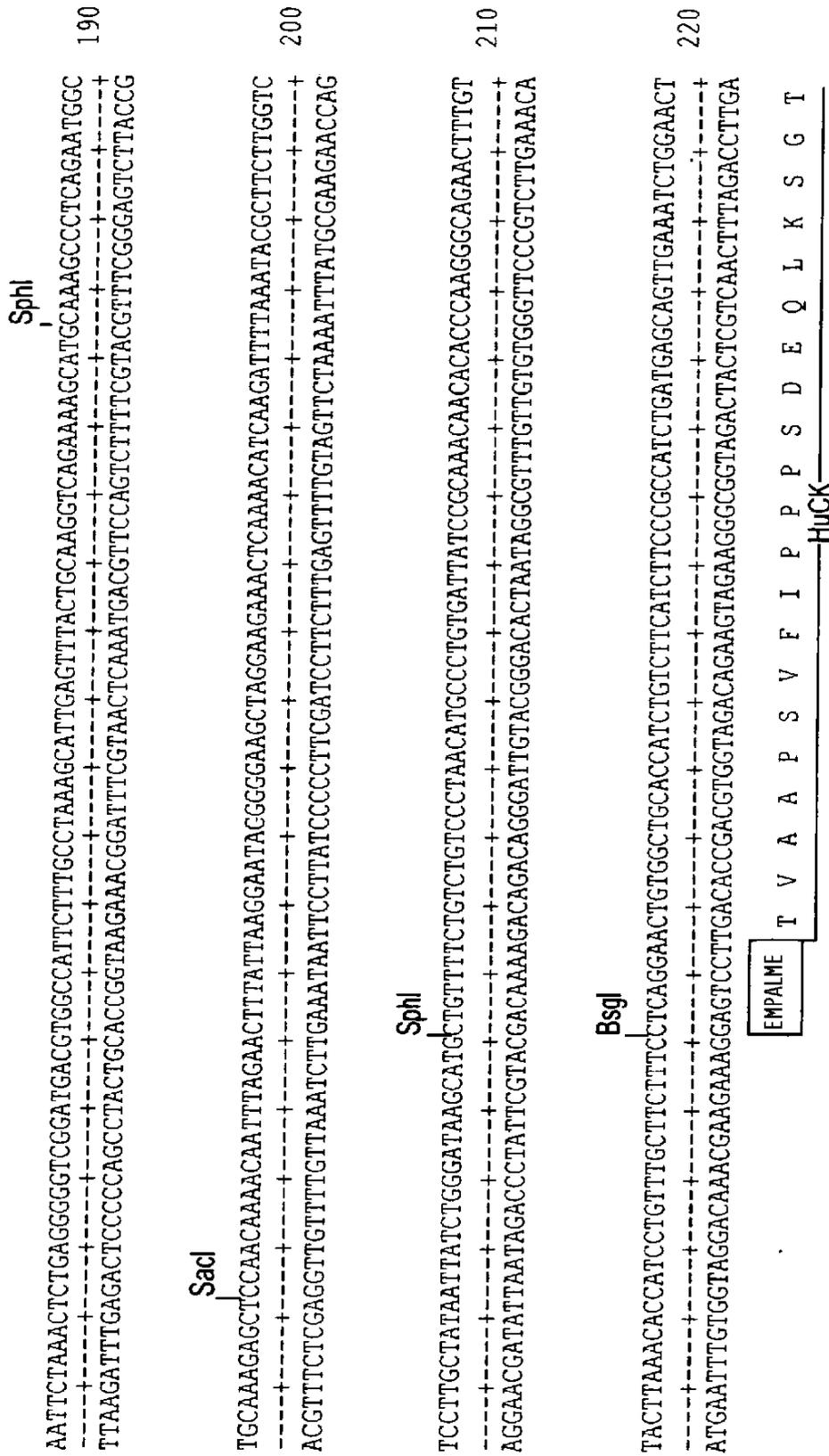


FIG. 15-4

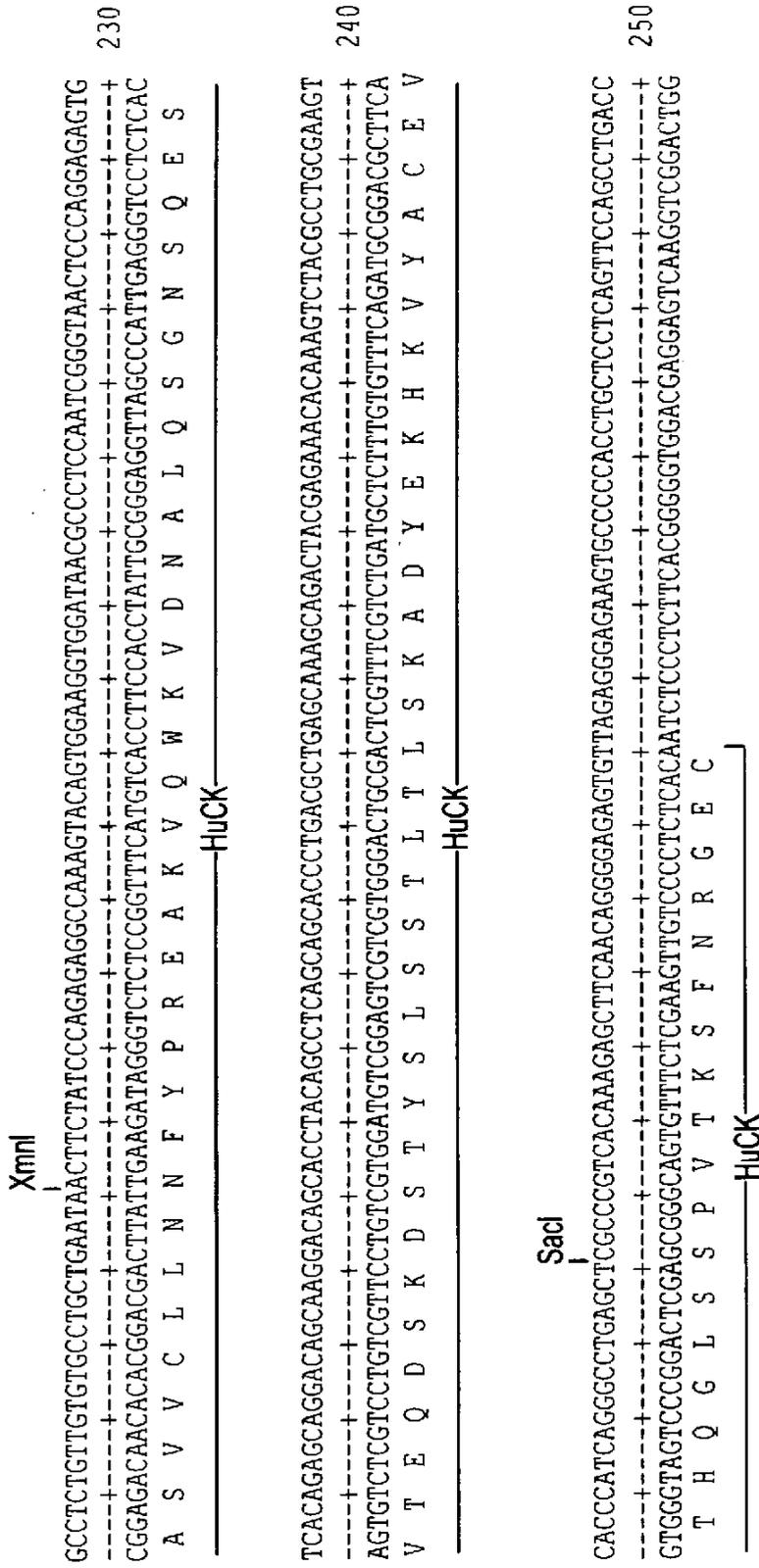


FIG. 15-5

```

CCCTCCCATCCTTGGCCTCGACCCCTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTAATTTGGGTCCCTCCAGCTCAICTTTCACTCACCCCCCTCCTCCTCCTTGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGAGGTAGGAAACCGGAGACTGGGAAAAAGGTGTCCCTGGATGGGATAACGCCACAGGAGTGGAGTAGAAAAGTGGAGTGGGGGAGGAGGGAACC
260

CTTTAATTAATGCTAATGTTGGAGGAGAAATGAAATAAAATAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTTCCCTCATTAAATAATTAATCTGTGTTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAAATAATACGATTACAACCCTCCTTACTTATTTATTTACITTAGAAAAGTGGACACCAAAAGAGAGAAAAGGAGTAAAATTAATAATAATAGACAACAAA
270

TACCAACTACTCAATTTCTTTAFAAGGACTAAATATGTAGTCACTCCFAAGGCGCATACCATTTATAAAAAATCACTCTTCATTTCTATTTTACCCTATC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGTTGATGAGTTAAAGAGAAATATCCCTGATTTATACATCAGTAGGATTCGCGGTATTTGGTAAATATTTTTAGTAGGAAGTAAGATAAAAATGGGATAG
280

ATCCTCTGCAATACAGTCCCTCAAAACCCACAAGCCTTCTGTCTCCACAGTCCCTCGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGTCTTCTTGTTCCTCCCTCCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGGAGACGTTATGTCAGGAGGGAGTTGGGTGTTGGGAAGACAGGAGTGTCCAGGGGACCCGGTACCATCCTCTCTGAAACGAAGGAACAAAAGGGGAGGA
290

CAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTTAAGGTGACAGGTCTTACAGTCAATAATCCTTTGATTCMAATCCCTGAGAAATCAACCAAGCAAATTTTTCAAAAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCGTTCCGGGAGTATCAGGAAAATTTCCCACTGTCCAGAATGTCAGTATATAGGAAAACTAAGTTAAGGGACTCTTAGTGGTTTCGTTTAAAAAAGTTTTC
300

AAGAAACCTGCTATAAAGAGAAATCATTCATTCGAACATGATATAAAATAACAACACAATAAAGCAATTAATAAACAACAATAAGGAAATGTTTAAGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCTTTGGACGATATTTCTTTAGTAAGTAACGTTGTACTATATTTTATTTGTTGTTTATTTTCGTTAATTTTGTGTTTATCCCTTTACAATAATCA
310

TCATCATGGTACTTAGACTTAATGGAAATGTCATGCCCTTATTTACATTTTTTAAACAGGTACTGAGGGACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTTATGAGTACTTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTAGTACCATGAATCTGAATTTACCTTACAGTACGGAAATAAATGTAAAAATTTGTCCATGACTCCCTGAGGACAGACGGTTCCTCCGCATGAAA
320

CCACAACCTAATTAATCCACACTATACTGTGAGATTAACAACATTCATTAATAATGTTGCAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAATAATATCTATAAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTGTGGATTAATTAGGTGTGATAGACACTCTAATTTTGTAAAGTAATTTTACAACGTTTCCAAGATAATTCGACTCTCTGTTTATATAAAGATATTG
330

```

NcoI
|

FIG. 15-6

```

XbaI
|
TCAGCAATCCCACCTCTAGATGACTGAGTGTCCCACCACCAAAAACCTATGCAAGAATGTTCAAGCAGCTTTATTTACAAAAGCCAAAATAATTGGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTCGTTAGGGTGAAGATCTACTGACTCACAGGGGTGGTGGTTTTTGATACGTTCTTACAAGTTTCGTCGAAATAAATGTTTTTCGGTTTTTAACCTTT
340

TAGCCCGATTGTCCAACAATAGAAATGAGTTATTAAGTGTGGTATGTTTATACATTAGAATACCCAAATGAGGAGAAATTAACAAGCTACAACACTATACCTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATCGGGCTAACAGGTTGTTATCTTACTCAATAAATTTGACACCAATACAAAATATGTAATCTTATGGGTACTCCTCTTAATGTTTCGATGTTGATATGGATG
350

TCACACAGATGAATCTCATAAAAATAATGTTACATAAGAGAACTCAATGCCAAAAGATATGTTCTGTATGTTTTTCATCCATATAAAGTTCAAAAACCAGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTGTCTACTTAGAGTATTTTTATTACAATGATTCCTCTTTGAGTTACGTTTTCTATACAAGACATACAAAAGTAGGTATATTTTCAAGTTTTGGTCCA
360

AAAAATAAAGTTAGAAAATTTGGATGGAATTACTCTTAGCTGGGGGTGGCGAGTTAGTGCCTGGGAGAAGACAAGAGGGGCTTCTGGGCTCTTGGTAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTTATTCAATCTTTAAACCTACCTTTAATGAGAATCGACCCCAACCCGCTCAATCACGGACCCTCTCTGTCTTCCCGGAAGACCCCAAGAACCATTT
370

TGTTCTGTTCCCTCGTGGGTTGTCAGTTATGATCTGTGCACTGTTCTGTATACACATTAAGCTTCAAAATAACTTCACATAAAGAACATCTTATACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAGACAGGAGCACACCCCAACACAGTCAATACTAGACACGTGACAAAGACATATGTAATACGAAGTTTTATTGAAGTGTATTTCTTTGTAGANAATATGG
380

PvuII
|
CAGTTAATAGATAGAGGAAATAAGTAATAGGTCAAGACCATGCAGCTGGTAAGTGGGGGGCTGGGATCAAAATAGCTACCTGCCTAATCCTGCCCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCAATTATCTATCTTCTCCTTATTCATTAATCCAGTTCTGGTAGCTCGACCATTACACCCCAACCCGACCTAGTTTATCGATGGACGGATTAGGACGGGAG
390

```

FIG. 15-7

```

TTGAGCCCTGAATGAGTCTGCC+TTCCAGGGCTCAAGGTGCTCAACAAAACAACAGGCTGCTATTTTCTGGCATCTGTGCCCTGTTTGGCTAGCTAGGA
400
AACTCGGGACTTACTCAGACGGGAAGTCCCGAGTCCAGGAGTGTGTTGTTCCGGACGATAAAAGGACCGTAGACACGGGACAACCGATCGATCCCT
GCACACATACATAGAAAATTAATGAAACAGACCTTCAGCAAGGGACAGAGGACAGAAATTAACCTTGCCAGACACTGGAACCCCATGTATGAACACTCA
410
CGTGTATGTATCTTTAATTTACTTTGCTGGAAGTCCCTTCCCTGCTCCTGCTCTTAATTTGAAACGGGCTGTGACCTTTGGGTACATACATTTGTGAGT
CATGTTTGGGAAGGGGAAGGCCACATGTAATGAGGACTCTTCCCTCATTTCTATGCGGCACCTTGCCCTTGCCTCTCAGCTACTCATCCATCCCAACAC
420
GTACAAACCTTCCCCCTTCCCGTGTACATTTACTCCTGAGAAGGATAAGATAACCCCTGAGACCCGGGACGGGAGAGTCCGATGAGTAGGTAGGTTGTG
XmnI
ACCTTTCTAAGTACCTCTCTGCCCTACACTCTGAAGGGTTCAGGAGTAACTAACACAGCATCCCTTCCCTCAAATGACTGACCATCCCTTTGTCCCTGC
430
TGGAAAGATTCATGGAGAGAGACGGATGTGAGACTTCCCAAGTCCCTCATTTGATTTGTCTGTAGGGAAAGGAGTTTACTGACTGGTAGGGAAACAGGAGC
TTTGTTTTCTTTCCAGTCACTGGGAAAGTGGGAAAGTGGGAAAGTCAATGGAANAACATACATAAGGAAGCACCTTGCCCTTCTGCCCTTTGAGAAATGTTG
440
AAACAAAAGAAAGGTCAGTCAATGACCCCTTTCACCCCTTCTCAGTACCCTTTTGTGATTTCTTCTGGAACGGGAAGACGGGAGAACTTTTACAAAC
ATGAGTATCAAATCTTCAAACCTTTGGAGGTTTGAGTAGGGGTGAGACTCAGTAATGTCCCTTCCAATGACATGAACITGCTCACTCFCCTGGGGGCC
450
TACTCATAGTTTAGAAAGTTTGAAACCTCCAACCTCATCCCCACTCTGAGTCATTAACAGGAAGGTTACTGTACTTGAACGAGTGAAGTAGGGACCCCGG
EcoRI
AAATGAACAATCAAAGGCAGGATAATCCAGTTATGAATCAAACCTTCTTCTCAGAAGATAACACTCTGAAGGGAAACCCACCAATAACCTTAAGCAAG
460
TTTAACTTGTAGTTCCCGTCCGTATTAGGTCAATACTTAAAGTTTGGAAAGAGAGTCTTCTATTGTGAGACTTCCCTTTGGGTGGGTAATGGATTCGTTTC
PstI
TGAAGACAGGTGCTGCAGGTGGAATTTGTGTCCCTTCAAAAAGGTAATGCTCAACTCCCTTGGTACTCATAAATGGGTCAATAAATGTGACTTTATTT
470
ACTTCTGCCAGGCTCCACCTTAACACAGGAAGTTTTTCCATACGAGTTGAGGAACGAGAACCATGAGTATTTACCCAGTGTATTTACACTGAAATAA

```

FIG. 15-8

```

TGGAAATAGGGTCTTTGCAGAGGTAAATCAAGTCAAAAATAGGCATAGTAAATGTTGTGAGGATCGGGTGAAAAATGGATCATTTCATATATTGCTGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
ACCTTTATCCCAGAAACGGCTCCCAITTAGTTCAGTTTTAATCCAGTAGACTTTACAACACTCCACGCCACTTTACCTAGTAGTATATAACGCCACCAC

      XbaI
      |
GGAATATAAAGGGYATAGCTACTTAGAAAAATAGTTGTCAGTTTCTTGAAAAACTAAACAANAAGACACCCTACCATATGACCCAGGAATTTGTACTCCTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 490
CCTTATATTTCCCATAICGATGAGATCTTTTATCAACAGTCAAGAACTTTTGTGATTTGTTCTGTGGATGGTATACTGGGTCCTTAACATGAGGAAC

GGAATTTACCCAGGAAATPAAAAACTTATGTCCACACAGAACCCATACATGATTGTTACAGCAGCTTTATTTGTTGTAGCCAAAGCTAGAAAAGAGCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 500
CCTTAAATGGGGTCCCTTATTTTGAATACAGGTGTGTCTTGGGTATGTACTAACAAAGTGTGTCGGAATAAACAAACATCGGTTTCGATCTTTTCGCGGT

ACCCATCCCTCAATAGGCAACTAGCCTAACAAATTGTAATATATCCATGCCATAGAATGCTATGAGGCAATAAAAAGGAACGGAAGTGTTCATACAGAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 510
TGGGTAGGAGTTATCCGTTGATCGGATGTTTAAACATTATATAGGTACGGTATCTTACGATACTCCGTTATTTTCCITTCACAAGTATGTCCTT

CTGGAGTGAATCTGAAGGACTTCTACTGAGTGAAAAAGCCAACTGAAAGGGTCAACATACCATGTGATTCCTTTTATGTAAACATTTGTTGAAGTGACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 520
GACCTCACTAAGACTTCCTGAAAGATGACTCACTTTTTTCGGTTAGACTTTTCCCAGTGTATGGTACACTAAGGAAATACATTTGTAACAACACTTCACTGTT

```

FIG. 15-9

```

XmnI      BglII
|          |
AAATTATAGGGATAGAGAAACAGATTCTGGTGCAGGGGTAGGGTGGAGAAAGAGAGTAGGGAAACTATAAAGGGAGATCTTTTGTGATCATGGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAATATCCCTATCTCTTGTCTAAGACCACAGGGTCCCCCAATCCCACCCTCTTCTCTCATCCGGCTTIGATATTTCCCTCTAGAAACACTAGTACCCT
530

XbaI      BglI
|          |
TAAATCTGTATCTTGAATGCAGTGGTAGTGCAGGCATCTAGACATGTGATAAAATGACATAGAACTGTACACACTTATTTTATCAATGICAAATTCITG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTAGACATAGAACTAACGTCACCAATCAACGTCCTCCGTAGATCTGTACACTATTTTACTGTATCTTGCACATGTGTGATAAATAATAGTTACAGTTTAAGAAC
540

BsgI
|
GTTTAAATATCGTACTGTAAATTACGTAAGAAGTAACCAACAGGAGAAACTGGGTGCAGGACACATCAGACCCTCTGTGCTTTATATCCGTGCTTTGCTACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CAAAATTAAGCATGACATTAATGCATCTTCAATGGTTGTCCTCTTTTGACCCACGTCCTCTGTGTAGTCTGGAGACACGAAATATAGGACAGAAACCGATGA
550

TTCTGTGAATCTATAAATATTTCCAAATAAATTTTTTAAACTTTTTTTTATGCTGGATCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGACACTTAGATATAATAAAGGTTTATAAAAAAATTTGAAAAAATAACGACCTAGC
5561

```

FIG. 15-10

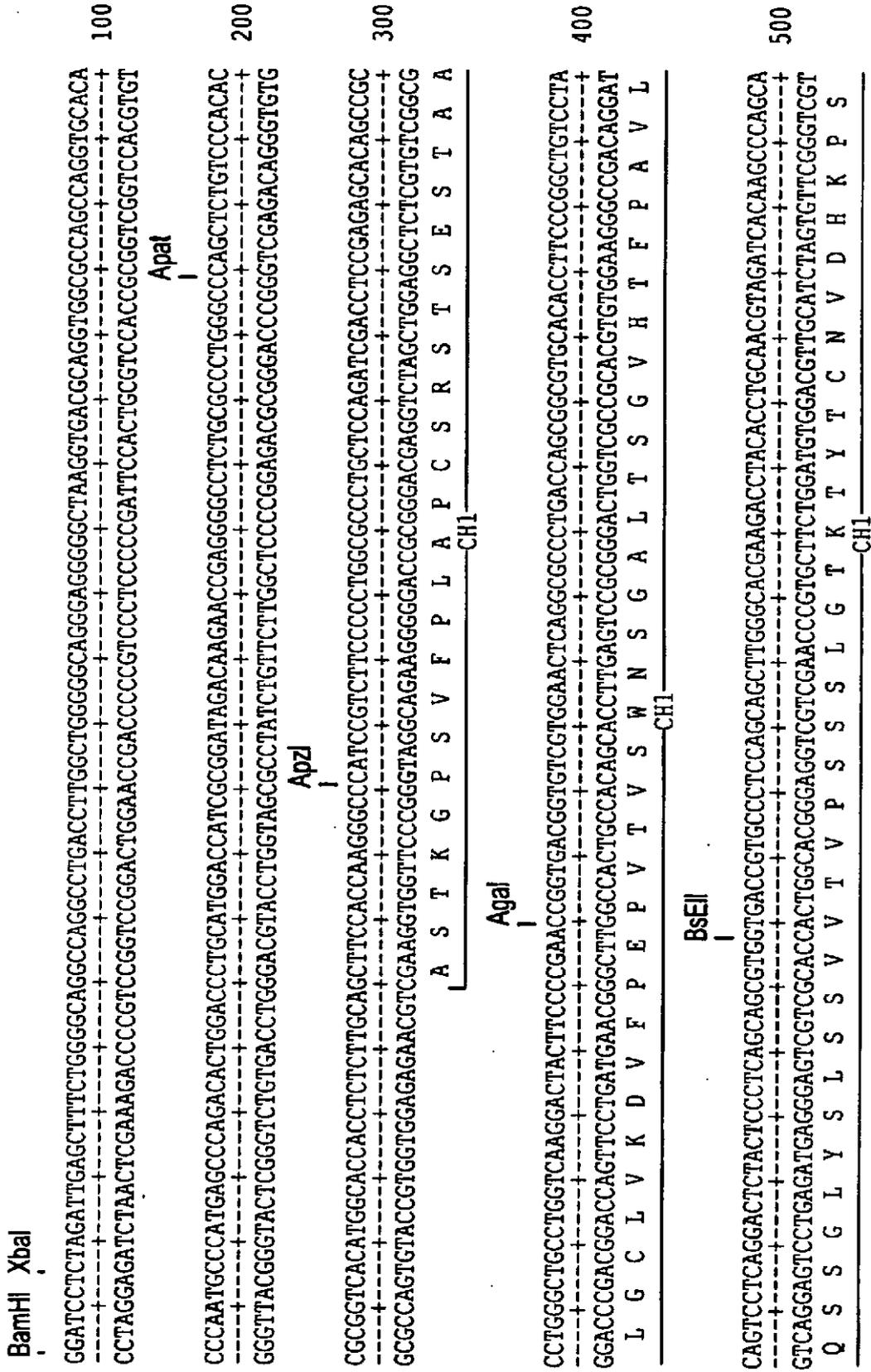


FIG. 16-1

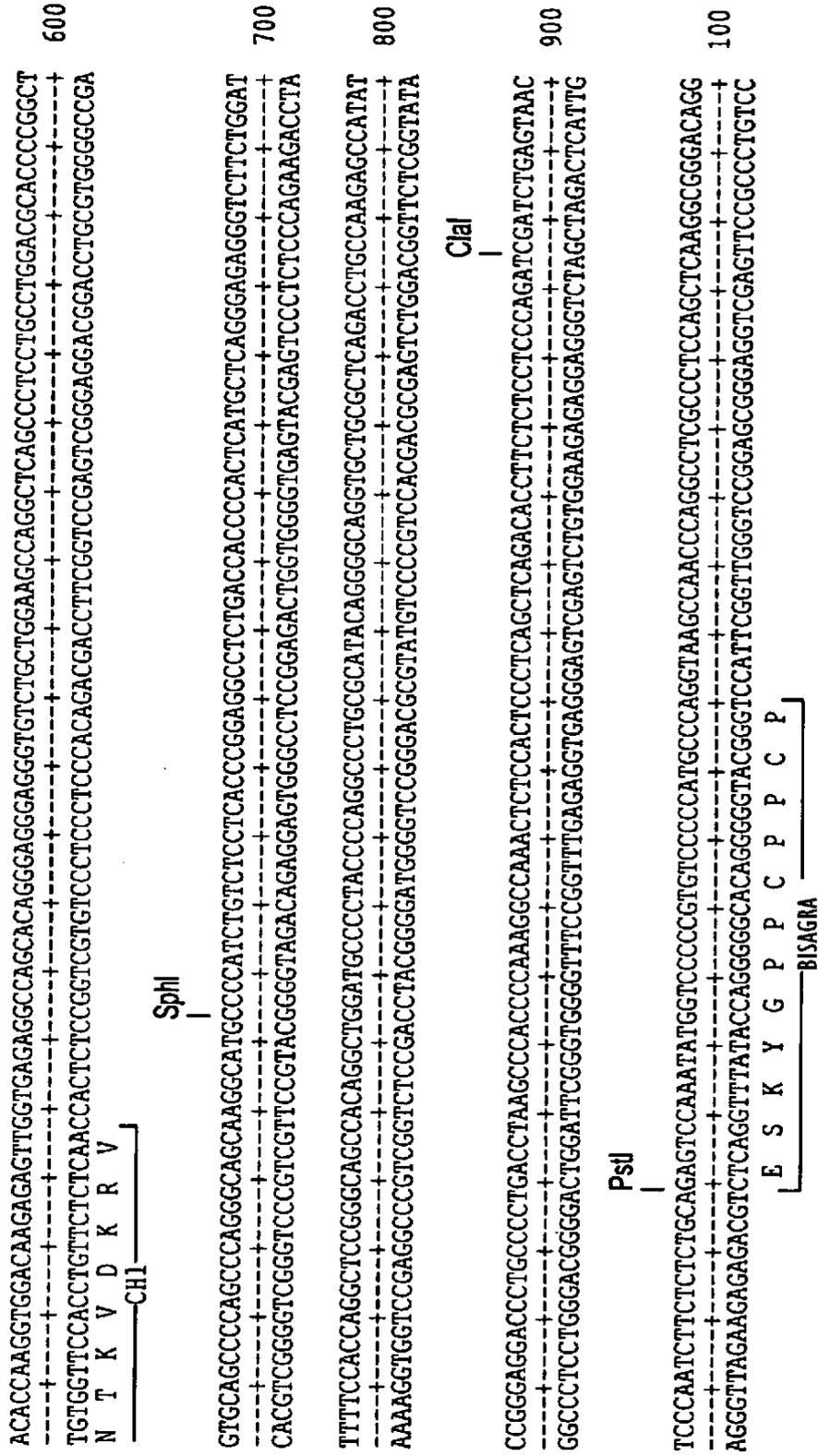


FIG. 16-2

TGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTCTCCCTCAGCACCTGAGTTCTGGGGGACCATCA
 110
 ACGGATCTCATCGGACGTAGGTCCCTGTCCGGGGTCGGCCACGACTCGTAGGTGAGGTAGAGAAGGACTGGTGGACTCAAGGACCCCTGGTAGT
 A P E F L G G P S
 CH2
 GTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGTACGTCACGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGG
 120
 CAGNAGGACAAGGGGTTTGGGTCCCTGTGAGAGTACTAGAGGGCTGGGACTCCAGTGCACGCCACACACCTGCACCTCGTCCCTCTCCGGGCTCC
 V F L P P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S Q E D P E
 CH2
 TCCAGTTCAACTGGTACCTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGGAGGAGCTTCAACAGCACCGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCT
 130
 AGGTCAAGTTGACCATGCACCTACCGCACCTCCAGTATFACGGTTCGTTCGGGCCCTCCTCGTCAAGTTGTCGTGCATGGCACACCCAGTCCGAGGA
 V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L
 CH2
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGATCAAGTGCAGGTCTCCAAACAAGGCCCTCCCGTCCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 140
 GTGGCAGGACGTGGTCCCTGACCGACTTGCCTCATGTCACGTCCAGAGTGTTCGGAGGGCAGGAGGTAGCTCTTTGGTAGAGGTTTCGG
 T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A
 CH2
 AAAGTGGACCCACGGGGTGGAGGGGCACATGGACAGGTGACGCTCGGCCACCCCTTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACA
 150
 TTTCCACCCTGGGTGCCCCACCGCTCCCGGTACCTGCTCCAGTCGAGCCGGTGGGAGACCGGACCCCTCACTGGCGACACGGTTGGAGACAGGGATGT
 K
 CH2
 GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACCCCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTACC
 160
 CCCGTGGGGCTTCGGTGTCCACATGTGGGACGGGGTAGGGTCTCCTCTACTGGTCTTGGTCCAGTGGACTGGACGCCACCAAGTTCCGAAGATGG
 G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y
 CH3

FIG. 16-3

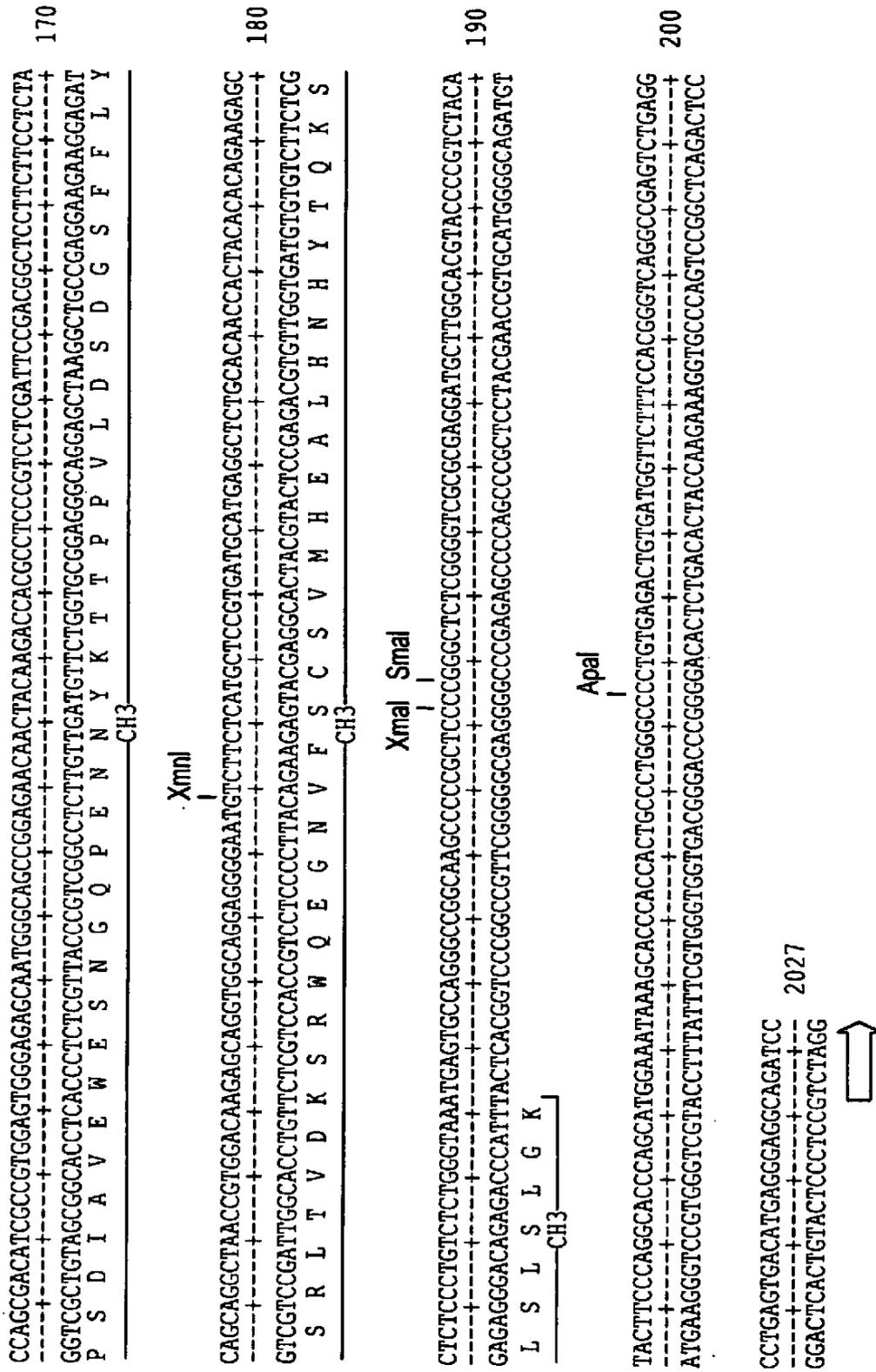
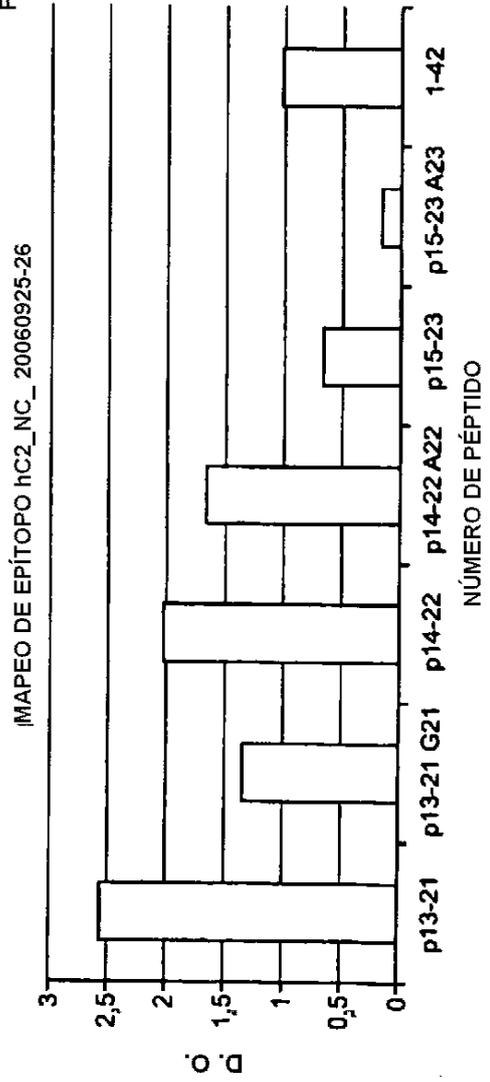
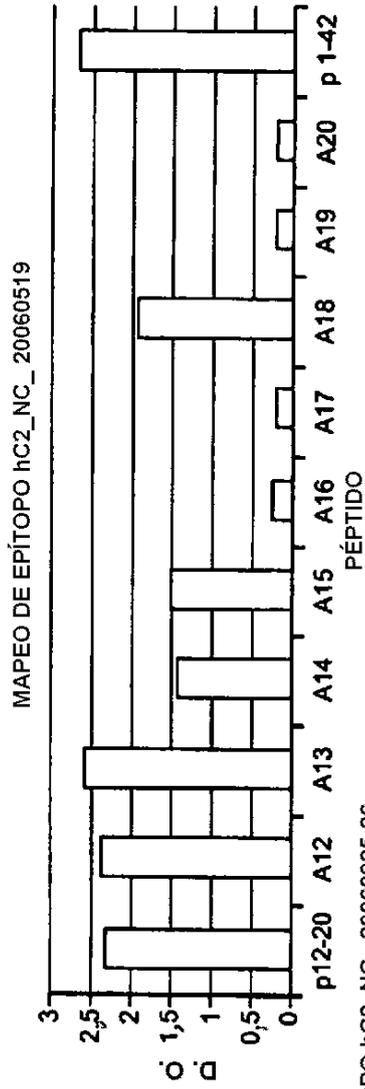
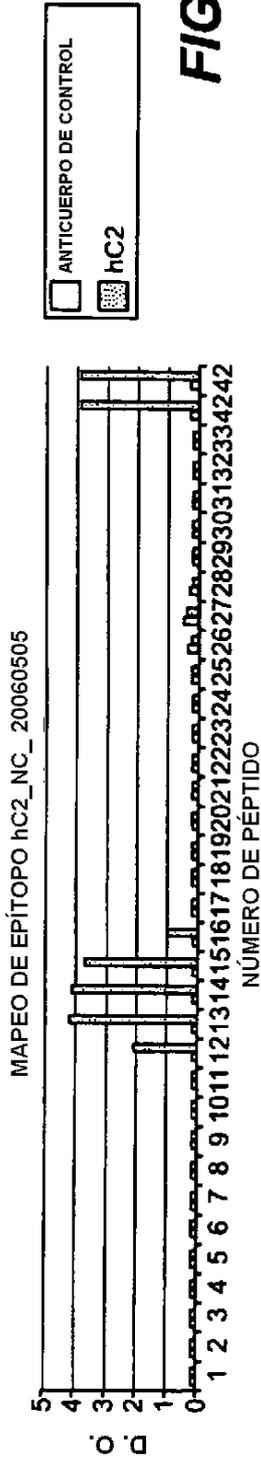


FIG. 16-4



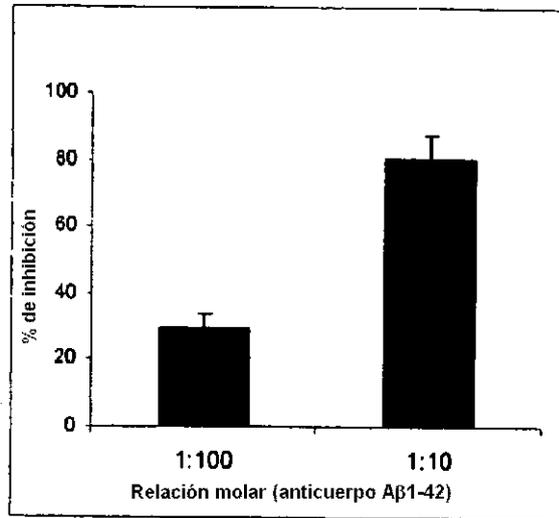


Fig 18

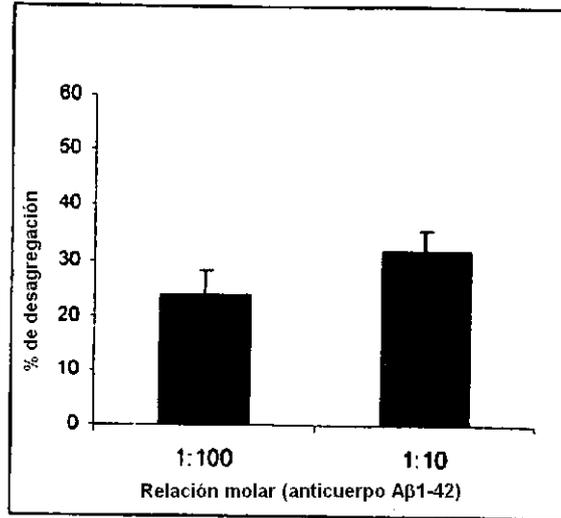


FIG 19

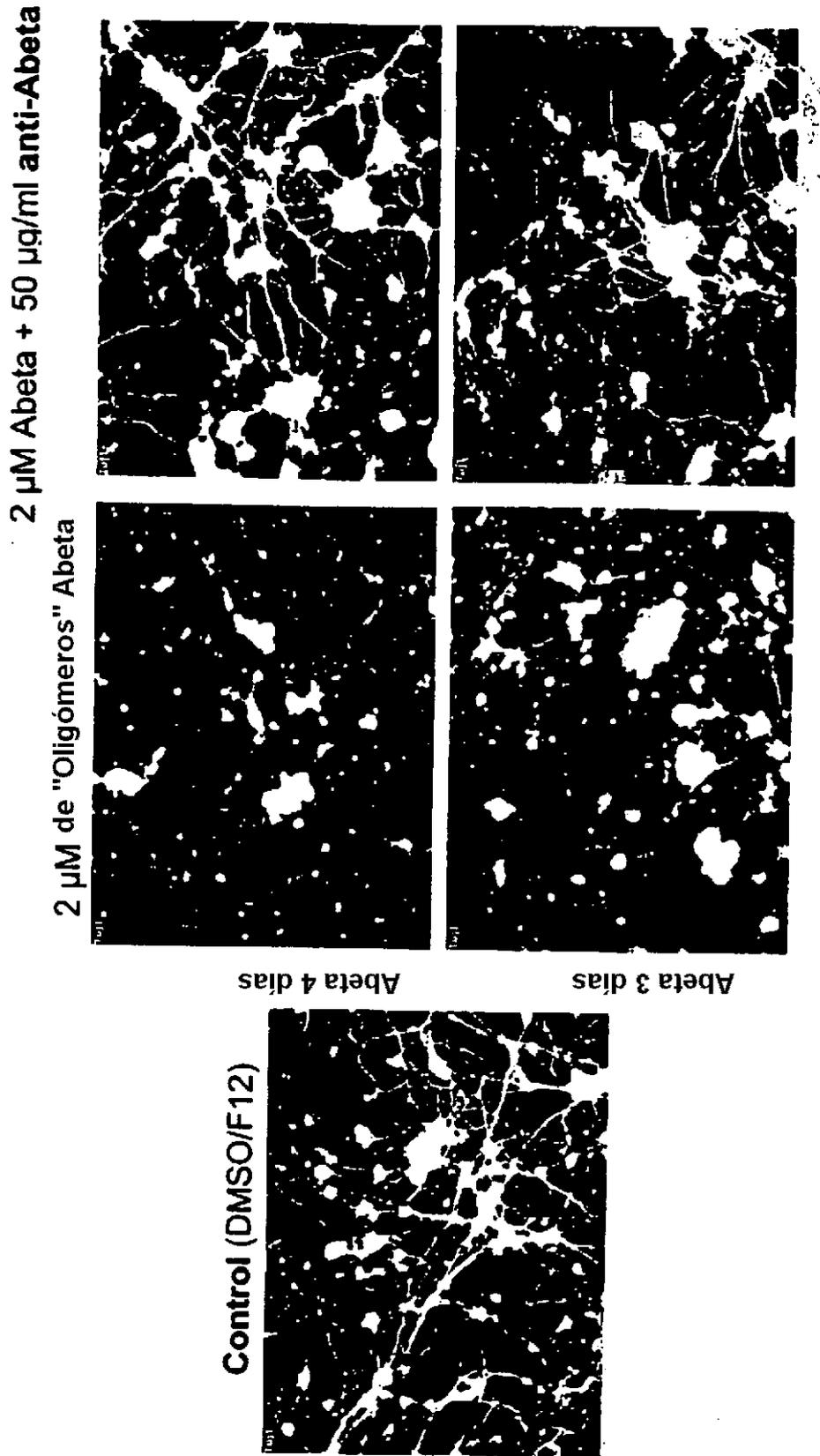


FIG 20